

理研NMR施設成果非占有利用報告書

10-200-035

利用機関名	広島大学	
実施部署名	理学研究科 数理分子生命理学専攻	
実施責任者管理職名・氏名	教授・楯 真一	
実施部署所在地		
実施部署連絡先		
利用課題名 (利用目的)	高磁場 NMR 利用による高分子量タンパク質分子形態変化解析技術の高精度化	
利用実施時期及び期間	平成 22 年 10 月 1 日～平成 23 年 3 月 31 日 総利用日数 : 28 日 当初計画変更 (変更理由) 3 月 11 日の地震により予定したデータ集積が途中で止まり, 今期中のデータ取得ができなくなった.	
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 12 月 6 日～平成 22 年 12 月 13 日 利用期間 2 : 平成 23 年 2 月 7 日～平成 23 年 2 月 14 日 利用期間 3 : 平成 23 年 3 月 7 日～平成 23 年 3 月 14 日 利用装置② ・ (○) 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 23 年 2 月 7 日～平成 23 年 2 月 14 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 利用装置③ ・ () 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 23 年 3 月 7 日～平成 23 年 3 月 9 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
	立体構造解析パイプライン	・ 発現確認 : 利用回数 回 ・ フォールド判定 : 利用回数 回 ・ 大量調製 : 利用回数 回 ・ 構造決定 : 利用回数 回
利用満足度 (複数選択不可)		(○) 大いに満足、() ほぼ満足、() やや不満、 () 大いに不満
成果の概要	実施内容	核内受容体蛋白質の基質結合ドメイン (30 kDa) の基質依存的な分子形態変化観測を目的として、当該蛋白質の異なる基質との複合体の主鎖 NMR シグナル帰属をおこなうために Trosy 検出による 3 重共鳴実験を行った。(12 月 700MHz, 3 月 800MHz 測定)。 酵素の動的構造特性を解析することを目的として、T_2 緩和分散測定を行った。2 つの観測周波数を利用する必要があるため、600MHz/700MHz を用いた同時測定を行った。(2 月 600MHz/700MHz)。 核内受容体蛋白質 ($^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識体) の基質結合ドメインについては、700MHz の Trosy 3 重共鳴測定で良好なシグナルを得ることができた。今回利用したリガンドでは、これまでに帰属を完了している化合物に比べて観測されるシグナル数が少なかったが(構造揺動によるシグナル広幅化が原因と考える)、基質結合部近傍のシグナル帰属を終えることができた(12 月)。 3 月には、さらに別の化合物との複合体状態にある同じ核内受容体蛋白質の Trosy 3 重共鳴実験を進めた。Trosy 効果による、観測信号の先鋭化のために高い分解能でのスペクトル観測が可能であった。しかし、当該測定は 3 月 11 日の地震の影響による停電のため測定が中断された。このため解析するに十分なデータセットの集積はできず、目的とした主鎖のシグナル帰属はできなかった。試料

		の長期保存は困難であるため、早い時期に測定再開が必要である。 2月には、20 kDa 程度の酵素の動的構造特性を解析するために T_2 緩和分散測定を行った。600MHz/700Mz の2つの観測磁場強度を用いて並行してデータ集積を行った。^{15}N 核スピンの反転パルスに composite パルスに変更して観測磁場強度に依存した off-resonance 効果を抑制する修正を行い測定を行った。3点の異なる温度で、変異体と野生型2種類の酵素の緩和分散測定を行った。今回の測定から、活性部位から離れた位置に導入した変異では低存在率構造には大きな変化が無いが、揺らぎの構造転移の活性化エネルギーに明らかな変化が生じていること、また、その際のエントロピー、エンタルピーの寄与が野生型とは大きく変化していることが分かった。
	本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較	高分子量タンパク質の分子形態変化観測という目的に向けて、理研装置を使って主に主鎖のシグナル帰属を得るための実験を進めた。結果、目的としていた核内受容体蛋白質が基質である化合物に応じて立体構造を変化させることを観測することができた。今期の実験では、1種類の化合物複合体しか解析できなかったが、今期の成果をもとにして来期はさらに別な化合物との複合体を解析する。 また、蛋白質の動的構造特性を解析するために T_2 緩和分散測定を用いて酵素の動的構造解析を行った。活性部位から離れた位置に導入したアミノ酸変異が構造転移の過渡的状态における構造を変化させることを定量的示すことができた。 最終的には、当初の目的をほぼ達することができた。ただし、地震による停電でデータ取得が完了できなかった実験については、来期に持ち越すことになった。

	今後の展開、課題	今期の研究で、スピン緩和を用いた動的構造解析、また、DIORITE 法と呼んでいる独自の方法を用いた核内受容体蛋白質の立体構造解析技術の基盤を確立できた。 DIORITE 法の応用については、今期の研究で高磁場装置で得たデータに基づく解析を可能とする解析法の修正が完了したため、今後膜蛋白質を含む複数の系に適用が可能となった。 T₂緩和分散測定による酵素の動的構造解析研究については、わずかな観測量の変化を定量的に観測するために、試料調製(amber tube 利用, アルゴンガス封入)や、試料の状態変化を避けるための短期間でのデータ集積、測定パルスプログラムの修正、解析ソフトウェアの作成・整備など多くの問題を解決する必要があったが、それら全てを克服して完全な解析が可能となった。今後は、この測定・解析システムを利用して、様々なアミノ酸変異の動的構造に対する影響を調べる。
成果公開延期の希望の有無		() あり : (○) なし 「あり」の場合理由:
利用における感想 (改善要望等を含む)		NMR管理室の行き届いた機器維持のおかげで、いずれの測定においてもスムーズに実験を進めることができて感謝致します。
利用周辺環境に関する希望		控え室を利用させていただけて、長期の測定期間中も論文作成を継続するなど有意義に過ごすことができました。感謝致します。
今後の利用形態の予定		() 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 具体的に 成果非占有の外部利用 (有料) を考えている。
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

その他	(上記の項目以外でご意見等お願いします。) 今回のように装置が不測のトラブルで停止して、当初予定していた実験が完了できなかった場合には、1週間で予約した経費の日割りで換算いただけると大学の経理に対しても説明がしやすい。予定していた実験が、不測の事態で中断してしまい結果的に必要なデータ集積ができずに出張を終える上に、装置の利用時間単価も上がるのでは遠隔地からの外部利用者に2重の負担になると思うので課金システムを検討いただけるとありがたい。

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。

特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は必ず事前にご相談ください。