

理研NMR施設利用報告書

(トライアルユース)

10-500-008

平成 23 年 7 月 8 日

利用機関名	日本ハム株式会社	
実施部署名	中央研究所札幌サテライト	
実施責任者管理職名・氏名	研究員 / 藤村 達也	
実施部署所在地	札幌市北区北 21 条西 12 丁目 コラボほっかいどう 3F	
実施部署連絡先		
利用課題名	低温活性酵素を利用した低温増殖食品微生物の制御	
利用目的・内容	本研究では、低温活性を持つことが明らかにされている昆虫由来のリゾチームをモデルとして、その NMR 信号の帰属を行い、その立体構造及び運動性に関する解析を進め、低温活性発現のメカニズムを明らかにすることを目的とする。	
利用実施時期及び期間	平成 22 年 9 月 21 日～平成 23 年 3 月 20 日 総利用日数：以下、利用施設参照 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 23 年 1 月 17 日～平成 23 年 1 月 30 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 22 年 12 月 22 日～平成 23 年 1 月 3 日 利用期間 2：平成 23 年 1 月 17 日～平成 23 年 1 月 26 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 1 月 4 日 利用期間 2：平成 23 年 1 月 4 日～平成 23 年 1 月 16 日 利用期間 3：平成 23 年 1 月 4 日～平成 23 年 1 月 16 日
	立体構造解析 パイプライン	・ 発現確認 ： 利用回数 3 回
		・ フォールド判定 ： 利用回数 3 回
		・ 大量調製 ： 利用回数 1 回
		・ 構造決定 ： 利用回数 1.75 回(構造×1、パートベーション×1、緩和×2)
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	※実際に行った作業の概要について記載してください。 立体構造解析パイプラインの無細胞系を利用して、研究対象の昆虫リゾチーム、その変異体及びコントロールとなる、ニワトリ及びヒトのリゾチームの発現実験を行った。その結果、コントロールと比較する若干の安定性の問題はあったものの、昆虫リゾチームの合成に成功した。複数のジスルフィド架橋を有する試料であったが、ジスルフィド架橋に対応した無細胞系の利用で効率的な発現が確認できた。また、フォールド判定の結果立体構造形成が確認されたため、大量調整を進め、NMR 測定条件を検討した後に、構造決定へと順調に解析を進めることが出来た。 信号帰属、立体構造計算に加えて、低温活性発揮のメカニズムとの関連の解析に有用と考えられる、温度変化によるスペクトルの変化及び緩和測定及びその解析についても順調に進めることが出来た。
	本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較	※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。 昆虫リゾチームについては、興味深い低温活性を有することが明らかになっており、低温域での各アミノ酸残基の運動性や揺らぎに関する解析は興味深いテーマであったが、試料調整の問題があり、NMR 法による解析は困難であった。 本課題により、無細胞系の活用により NMR 解析用の試料を安定に得ることができたことにより、NMR 法による昆虫リゾチーム解析の基盤となる、信号帰属を迅速に行うことが出来た。 この点で当初目標の成果を十分に達成出来たと言える。

	今後の展開、課題	※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。 昆虫リゾチームは、低温活性を有するのみならず、グラム陰性菌に対して、既知の脊椎動物リゾチームよりも高い活性を示すことが知られている。現在、すでに日持ち向上剤として食品添加物に利用されているリゾチームのより効果的な応用利用を考える上でも、昆虫リゾチームに特徴的なグラム陰性菌に対する作用機序を検討することは重要な課題であり、今回の成果をさらに応用して NMR 法を用いた微生物由来成分との相互作用解析などへの展開により、有用な知見を得ることも期待できる。
社会・経済への波及効果の見通し		リゾチームを利用した添加物は、国内では現在年間約 1,000 t (10 億円以上) 生産されており、幅広く利用されている。遺伝子組換え技術等により製造した低温活性リゾチームを食品添加物等に直接利用することは困難ではあるが、低温活性を持つリゾチームの作用機構の理解が深まることで、食品産業で重要となる製品の安全性への大きな貢献へとつなげることが期待できる。
成果公開延期の希望の有無		(○) あり : () なし 「あり」の場合理由：特許出願等の検討中のため

理研 NMR 施設利用における感想	※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。 極めて短期間で、長年の課題であった NMR 法による昆虫リゾチームの解析を効率よく進めることが出来た。理研 NMR 施設の立体構造解析パイプラインのレベルの高さを実感することができた。
利用周辺環境に関する希望	トライアルユースは立体構造解析を基にしたタンパク質の応用利用について、企業での研究を進めるためのハードルを下げることに大きく貢献出来ると感じた。引き続きこの様な形でトライアル等の開放を行うことは有効であると感じている。
今後の利用形態の予定	(☒)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： (☐)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	(http://kyoyonavi.mext.go.jp/) (☐) 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。)

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。