

**理研NMR施設利用報告書**  
(トライアルユース)

10-500-009

|              |                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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丁目38番5号                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                           |
| 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 <sup>2+</sup> 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 の結合部位に関する知見を得ることを目的とする。無細胞発現系で調製した <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N 標識 Triflin に対して天然 SSP-2 を添加し、NMR を用いた相互作用解析を行った。 |                                                                                                                                                                                                                                           |
| 利用実施時期及び期間   | <p>平成 22 年 9 月 16 日～平成 23 年 3 月 15 日</p> <p>総利用日数：以下、利用施設参照</p> <p style="text-align: center;">当初計画どおり・当初計画変更<br/>(変更理由)</p>                                                    |                                                                                                                                                                                                                                           |
| 利用施設         | NMR 装置<br>(該当部分に○)                                                                                                                                                              | <p>利用装置①</p> <p>・ (     )600MHz、(   ○   )700MHz、(     )800MHz、(     )900MHz<br/>(     )低温プローブ付 (     )固体プローブ付 (     )サンプリングチャージャー付</p> <p>利用期間 1：平成 23 年 1 月 24 日 ～ 平成 23 年 2 月 6 日</p> <p>利用期間 2：平成 23 年 2 月 14 日 ～ 平成 23 年 2 月 24 日</p> |

|                           |                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                           |                                                            | <p><b>利用装置②</b></p> <p>・ (    )600MHz、(    )700MHz、(    )800MHz、(    )900MHz<br/> (    )低温プローブ付 (    )固体プローブ付 (    )サンプル<br/> チェンジャー付</p> <p>利用期間 1：平成 22 年 10 月 7 日 ～ 平成 22 年 10 月 14 日<br/> 利用期間 2：平成 23 年 1 月 24 日 ～ 平成 23 年 2 月 6 日<br/> 利用期間 3：平成 23 年 2 月 14 日 ～ 平成 23 年 2 月 24 日</p> <hr/> <p><b>利用装置③</b></p> <p>・ (    )600MHz、(    )700MHz、(    )800MHz、(    )900MHz<br/> (    )低温プローブ付 (    )固体プローブ付 (    )サンプル<br/> チェンジャー付</p> <p>利用期間 1：平成 22 年 10 月 18 日 ～ 平成 22 年 11 月 11 日<br/> 利用期間 2：平成 23 年 2 月 7 日 ～ 平成 23 年 2 月 8 日<br/> 利用期間 3：平成 23 年 2 月 7 日 ～ 平成 23 年 2 月 13 日<br/> 利用期間 4：平成 23 年 2 月 7 日 ～ 平成 23 年 2 月 27 日<br/> 利用期間 5：平成 23 年 2 月 7 日 ～ 平成 23 年 2 月 27 日</p> <p><b>利用装置④</b></p> <p>・ (    )600MHz、(    )700MHz、(    )800MHz、(    )900MHz<br/> (    )低温プローブ付 (    )固体プローブ付 (    )サンプル<br/> チェンジャー付</p> <p>利用期間 1：平成 22 年 10 月 12 日 ～ 平成 22 年 10 月 25 日<br/> 利用期間 2：平成 23 年 2 月 16 日 ～ 平成 23 年 2 月 17 日</p> |
|                           | <p>立体構<br/>造解析<br/>パイプ<br/>ライン</p>                         | <p>・ 発現確認   ： 利用回数       回</p> <hr/> <p>・ フォールド判定   ： 利用回数       回</p> <hr/> <p>・ 大量調製   ： 利用回数   9 回</p> <hr/> <p>・ 構造決定   ： 利用回数   1 回(帰属×1、パートベーション×2)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <p>利用満足度<br/>(複数選択不可)</p> | <p>(    )大いに満足、(    )ほぼ満足、(    )やや不満、<br/> (    )大いに不満</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

|                          |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 成果の概要                    | 実施内容 | <p>※<b>実際に行った作業の概要について記載してください。</b></p> <p>1 : <math>^{13}\text{C}</math>, <math>^{15}\text{N}</math> 標識 Triflin の調製<br/>Triflin は、前トリアルユース (09-500-002) で最適化した合成条件を用いて NMR シグナル帰属測定用および天然 SSP-2 との相互作用実験用に <math>^{13}\text{C}</math>, <math>^{15}\text{N}</math> 標識したものを調製した。精製は、His タグによるアフィニティー精製、TEV プロテアーゼによる His タグ切断、His タグアフィニティー再精製による His タグ除去、SSP-2 結合カラムによるアフィニティー精製の行程で行った。</p> <p>2 : NMR を用いた Triflin と天然 SSP-2 との相互作用解析<br/>標識 Triflin の緩和解析は、極低温プローブ付 600 MHz 溶液 NMR 装置 (Bruker BioSpin) を、各種主鎖帰属用測定は、800 MHz NMR 装置、極低温プローブ付 600 MHz NMR 装置と 700MHz NMR 装置 (Bruker BioSpin) を用いて行った。滴定実験では、Triflin と SSP-2 混合液を、極低温プローブ付 700 MHz NMR 装置 (Bruker BioSpin)、2 次元 <math>^1\text{H}</math>, <math>^{15}\text{N}</math> HSQC スペクトルを用いて行った。100 <math>\mu\text{M}</math> の Triflin に対して、SSP-2 の濃度を 0 から 400 <math>\mu\text{M}</math> まで段階的に増加するように調整した。NMR の測定温度はすべて 298 K で行った。</p> <p>3 : リフォールディング検討用の非標識 SSP-2 の調製<br/>N 末端に His タグおよび TEV プロテアーゼ切断領域を付けた SSP-2 は、大腸菌無細胞タンパク質合成法により非標識のアミノ酸を用いて合成した。合成した SSP-2 は、沈殿画分として得られ、その沈殿物を溶媒 (1 M Tris-HCl (pH 8.0)) で 3 回洗浄した。続いて、SSP-2 沈殿物の可溶化試験およびリフォールディングを室町ケミカルにて検討した。</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>※<b>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。</b></p> <p>1 : <math>^{13}\text{C}</math>, <math>^{15}\text{N}</math> 標識 Triflin の調製<br/><math>^{13}\text{C}</math>, <math>^{15}\text{N}</math> 標識 Triflin の最終精製産物は、合計 3.89 mg 得られた。限外ろ過膜を用いた濃縮 (50 mM 酢酸, 150 mM NaCl, pH 5.0) で、Triflin の濃度が 250 <math>\mu\text{M}</math> まで濃縮可能であることが分かった。<br/>⇒分子内に 8 本のジスルフィド結合をもち、分子量が約 27kDa の Triflin の合成は無細胞発現系を用いても容易なものではなかった。しかしながら、理研スタッフの努力の結果、数多くの条件検討と精製段階を経て高純度で天然 Triflin と同等の SSP-2 結合活性をもつ <math>^{13}\text{C}</math>, <math>^{15}\text{N}</math> 標識 Triflin を NMR 測定可能な量まで調製することに成功し、次項の実験に進むことができた。</p> <p>2 : <math>^{13}\text{C}</math>, <math>^{15}\text{N}</math> 標識 Triflin と天然 SSP-2 との相互作用解析<br/><u>Triflin 緩和解析と主鎖シグナル帰属</u>: 156 個のシグナルにおける <math>^{15}\text{N}</math> 核の緩和時間から回転相関時間を算出したところ、12.1 nsec であった。この値から見積もられる見かけの分子半径は 24.3 Å であり、X 線結晶構造 (PDB 1WVR) から見積もられた単量体の大きさ (短径約 20 Å、長径約 30 Å) と一致した。主鎖アミド基由来のシグナルは 210 個観測されたが、シグナルの広幅化により、210 個中 92 個のシグナルについては配列特異的な帰属を得ることができた。<br/><u>Triflin と SSP-2 の相互作用解析</u>: 100 <math>\mu\text{M}</math> Triflin に対し、天然 SSP-2 を滴下し、SSP-2 結合状態の Triflin シグナルが新たに観測された。シグナルの強度変化が大きかった残基は N 末端側の PR-1 ドメインのⓈシートを中心とした領域に集まっていた。一方、シグナル強度</p> |

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          | <p>の変化がほとんど見られなかった残基は C 末端側の Cys-rich ドメインであった。</p> <p>⇒今回帰属した Triflin の残基数は全体の半分程度であったが、Triflin の構造全体に分布した領域で、偏りがなかったため SSP-2 の添加実験より、SSP-2 結合領域の同定は可能であると考えた。実際に NMR を用いた Triflin と SSP-2 の相互作用解析では、強い結合を示す交換が見られ、また、結合に大きく関与する残基のシグナル強度変化を観測することができ、結合領域の同定に成功した。この成果より本課題の当初の目標をほぼ達成したと考えられる。</p> <p>3：リフォールディング検討用の非標識 SSP-2 の調製<br/>SDS-PAGE 電気泳動より、今回合成した非標識 SSP-2 沈殿物は、5 mg 以上と見積もられた。10 mM DTT-6M グアニジン塩酸塩で可溶化した SSP-2 の 0.5～1 mg うち、リフォールディング後得られた SSP-2 は約 50 µg であり、今回のリフォールディング条件では、NMR 解析に使用する十分な量は得られなかった。</p> <p>⇒前トライアルユース (09-500-002) より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)の発現は困難であることが分かっていた。本課題では、試料調製に成功した Triflin の構造解析を中心とし、沈殿物の中に多量に含まれている SSP-2 のリフォールディングは室町ケミカルで条件検討することにした。しかしながら、構造解析ができる十分な量を得ることができなかった。限られた期間だったため、当初の予定どおり、研究開始二カ月以内にリフォールディングによる調製ができなかったため、SSP-2 の構造解析は見送った。</p> <p>本課題の当初の目標は主に実験 1 と 2 であったため、上記で述べたようにほぼ目標を達成した。</p> |
| 今後の展開、課題 | <p><b>※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。</b></p> <p><b>&lt;今後の展開方針&gt;</b></p> <p>本課題における Triflin の SSP-2 相互作用部位の同定は、構造学的視点から蛇毒蛋白質 Triflin に対する抗毒素蛋白質 SSP-2 の分子認識機構の解明に大きな知見となるにちがいない。今後の発展として、本課題から得られた情報をもとに、Triflin の変異体解析を行い、相互作用に関与する残基の再現性と特定を行う。さらに、本研究の最終目的である SSP-2 の Triflin 結合部位の同定を行うため、SSP-2 の構造解析も試みる。また、ハブ血清中での SSP 結合蛋白質 (HSF) を含めた三者間の相互作用解析などを行う。</p> <p><b>&lt;今後の課題&gt;</b></p> <p>抗毒素蛋白質 SSP-2 がどこでどのように毒素蛋白質 Triflin と結合し、阻害するのかを明らかにするためには、SSP-2 の Triflin との相互作用部位を同定しなければならない。そのためには、SSP-2 発現系の構築が必須となり、今後の大きな課題となるだろう。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>社会・経済への波及効果の見通し</b></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 <math>\text{Ca}^{2+}</math> 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。本課題の最終目的である毒ヘビ血清蛋白質が特異的にかつ効率的に抗毒素機能を発揮するメカニズムの解明は、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、低分子で多機能な抗毒素蛋白質 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><b>成果公開延期の希望の有無</b></p>      | <p>(    ) あり    :    ( ○ ) なし<br/> 「あり」の場合理由：</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <p><b>理研 NMR 施設利用における感想</b></p> | <p><b>※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。</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・本課題の採択後、最初の打ち合わせの段階で前トライアルユース (09-500-002) の問題点や改善点がまとめてあり、本課題の限られた期間内でどこまでなら成果を出せるかなどの目標設定が明確にされていた。そのため、理研の研究と並行して自分の研究室でできる実験を計画的に行うことができた。</li> <li>・本課題の進行中に問題点などがあるとすぐにメールや電話で連絡をもらったため効率よく研究を進めることができた。また、定期的に進行状況の報告があったため安心して研究を任せることができた。</li> <li>・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しても、親身に相談に応じてくれた。また、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も、分かりやすい丁寧な回答を頂き、とても勉強になった。</li> <li>・打ち合わせや成果報告の時にわかりやすく、丁寧な資料や報告書が用意されており、本研究を進行するための話し合いとして有意義な時間を過ごすことができた。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。</li> </ul> <p>一番うれしく、一番よかった点は、本研究課題に携わって頂いた理研 NMR 施設のスタッフの皆さんが本当にとっても親切で、自身の研究のように親身に本研究に取り組んでくれたことである。確認、確認、また確認といった予備的実験の多さには研究者として見習う点が多く、さすが理研研究スタッフという印象を得た。</p> <p>今回、東日本大震災の影響で研究遂行に大きな支障が出たにも関わらず、今回の成果を得ることができたことを心から感謝したい。</p> |

|                                             |                                                                                                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 利用周辺環境に関する希望                                | 外部の人でも食堂で食事ができると助かる(利用ができる場合、利用の仕方の説明などがあると助かる)。もしくは、食事場所の案内などがあれば助かる。                                                                                                                                                 |
| 今後の利用形態の予定                                  | <input type="checkbox"/> 再度本事業への申請を考えている。<br><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。<br><input type="checkbox"/> その他理研との共同研究等を考えている。<br>具体的に：<br><br><br><input type="checkbox"/> 未定                    |
| 今後期待するその他のサービス                              | <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)<br><input type="checkbox"/> NMR 装置利用の技術的なサポート<br><input type="checkbox"/> その他<br>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><br><input type="checkbox"/> 見た <input type="checkbox"/> 見ていない<br>感想等：このサイトでは課題の募集や採択の情報を分かりやすく得ることができる。イベント情報なども充実しているので、興味あるイベントは参加したいと思った。 |
| 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。