

理研NMR施設利用報告書

(トライアルユース)

10-500-014

利用機関名	株式会社ディーエイチシー 海洋深層水研究所	
実施部署名		
実施責任者管理職名・氏名	山田 勝久	
実施部署所在地	東京都港区南麻布 2-8-21 南麻布 MIC ビル 7 階	
実施部署連絡先		
利用課題名	ヒトチロシナーゼの立体構造解析とその阻害物質の開発	
利用目的・内容	チロシナーゼの 3 次構造は放線菌のチロシナーゼが報告されているのみであり、哺乳類のチロシナーゼについては報告が無い。そこで、本課題では、チロシナーゼとこれら阻害物質との相互作用を、原子レベルで解析することにより、3 次構造情報を基にした、阻害物質の改良あるいは新たな阻害物質の作製を行うことを目的としている。	
利用実施時期及び期間	平成 22 年 11 月 17 日～平成 23 年 3 月 31 日  総利用日数：6  <del>当初計画どおり</del> 当初計画変更 (変更理由)	
利用施設	NMR 装置 (該当部分)	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 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 <hr/> 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 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 <hr/> 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 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
	立体構造解析 パイプ ライン	・ 発現確認 : 利用回数 6 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	<p>※実際に行った作業の概要について記載してください。</p> <p>ヒトチロシナーゼを無細胞発現系を用いて、タンパク質合成を行った。まず、ヒトメラノーマ細胞からチロシナーゼ遺伝子のクローニングを行い、PCRを用いて増幅した直鎖状のDNAを鋳型として大腸菌由来無細胞合成反応でタンパク質発現実験を行った。</p> <p>アミノ酸配列に基づく機能領域の検索と二次構造の予測から、ヒトのチロシナーゼは1回膜貫通型のタンパク質で、N末から順にシグナルペプチド、メラノソーム領域、膜貫通領域、細胞質ドメインから成ると予想された。メラノソーム領域は、相同性の高い活性ドメイン(アミノ酸番号 152-385)が相同性の低い領域には含まれており、特にN末側は天然変性タンパク質とある程度相同性が見られた。シグナル配列を除いた全長(1-449)のほか、活性ドメイン(152-385)を含む様にN末端4種、C末端4種の組み合わせで、全16発現領域のコンストラクトの設計を行った。全長についてはN末端にHis-tag(N11)またはチオレドキシントグ(TrxAH6)を付けた状態で検討し、それ以外の領域はN末端にN11タグを付けた状態で発現を検討した。</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>※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。</p> <p>N末端にN11タグまたはTrxAH6タグを付けた全長(1-449)について、合成条件(合成温度、銅イオンの添加、非添加、PEGの添加、非添加等)を変化させ、タンパク質発現を検討した。いずれの条件においてもSDS-PAGE上で分子量に相当する位置に不溶性に発現が認められた。</p> <p>発現領域の検討では、多くの領域で発現が認められない、もしくは不溶性に発現が認められた。153アミノ酸残基から始まるいくつかの領域(153-449, 153-386)では、わずかながら可溶性に発現が確認されたものの、金属イオンの添加の有無で合成量や可溶性に変化が認められなかった。</p>

	<p>今後の展開、課題</p>	<p>※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。</p> <p>メラノソーム領域の発現は確認されたものの、いずれの条件下においても不溶性で得られた。可溶性促進効果が期待された TrxAH6 タグにおいても不溶性であった。発現領域を活性ドメイン付近に限局すると、一部の領域で可溶性に得られたものの、その発現量は少量であり、構造解析に必要な量を得るためには、スケールアップしさらなる検討を加える必要があると考えられる。また、わずかに得られた産物が正しくフォールディングしているか、単分散となっているかを見極めることは今後の課題となる。さらには、種々の分析可能な濃度にまで濃縮できるかが次に確認すべきステップとなり、今後も十分な検討が必要である。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>現在の結果では、社会・経済への波及効果は残念ながらないと思う。</p>	
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>( ) あり : ( O ) なし 「あり」の場合理由：</p>	
<p>理研 NMR 施設利用における感想</p>	<p>※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。</p> <p>残念な結果となりましたが、丁寧な報告書を作製して頂き、感謝しております。進捗状況について途中で連絡を頂ければ、今後の方向性についてもディスカッションが出来たのではないかと思います。多くのノウハウをお持ちだと思いますので、いろいろな提案等をして頂けると、大変助かります。</p>	

<p>利用周辺環境に関する希望</p>	<p>特になし</p>
<p>今後の利用形態の予定</p>	<p>( <input type="radio"/> )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  特になし</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="radio"/> ) 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。)  特になし
-----	-----------------------------------

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。