

理研NMR施設利用報告書  
(トライアルユース)

11-500-017

平成 24 年 6 月 13 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 2 1 条西 1 2 丁目 コラボほっかいどう 3F	
実施部署連絡先		
利用課題名	低温増殖微生物の制御に向けた低温活性酵素の解析	
利用目的・内容	本課題では、昨年度のトライアルユースで得られた低温活性リゾチームの常温及び低温での NMR 信号帰属情報、立体構造情報に加えて、さらに詳細な運動性に関する解析等を進めることで、低温活性発現の詳細なメカニズムを明らかにすることを目標とする。	
利用実施時期及び期間	平成 23 年 9 月 8 日～平成 24 年 2 月 29 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 ・ ( <input checked="" type="checkbox"/> ) 600MHz、( <input type="checkbox"/> ) 700MHz、( <input type="checkbox"/> ) 800MHz、( <input type="checkbox"/> ) 900MHz ( <input type="checkbox"/> ) 低温プローブ付 ( <input type="checkbox"/> ) 固体プローブ付 ( <input type="checkbox"/> ) サンプルチェンジャー付 利用期間 1：平成 23 年 10 月 3 日 ～ 平成 23 年 10 月 16 日 利用期間 2：平成 23 年 10 月 25 日 ～ 平成 23 年 10 月 30 日

	<p>利用期間 3 : 平成 23 年 12 月 5 日 ~ 平成 23 年 12 月 18 日</p> <hr/> <p>利用装置②</p> <p>・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="radio"/> ) 700MHz、( <input type="radio"/> ) 800MHz、( <input type="radio"/> ) 900MHz  ( <input type="radio"/> ) 低温プローブ付 ( <input type="radio"/> ) 固体プローブ付 ( <input type="radio"/> ) サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間 1 : 平成 23 年 9 月 8 日 ~ 平成 23 年 9 月 20 日  利用期間 2 : 平成 23 年 9 月 20 日 ~ 平成 23 年 10 月 2 日  利用期間 3 : 平成 23 年 9 月 22 日 ~ 平成 23 年 10 月 2 日  利用期間 4 : 平成 23 年 10 月 3 日 ~ 平成 23 年 10 月 13 日  利用期間 5 : 平成 23 年 10 月 3 日 ~ 平成 23 年 10 月 10 日  利用期間 6 : 平成 23 年 10 月 11 日 ~ 平成 23 年 10 月 16 日  利用期間 7 : 平成 23 年 10 月 11 日 ~ 平成 23 年 10 月 24 日  利用期間 8 : 平成 23 年 11 月 21 日 ~ 平成 23 年 12 月 4 日</p> <hr/> <p>利用装置③</p> <p>・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="radio"/> ) 700MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 800MHz、( <input type="radio"/> ) 900MHz  ( <input type="radio"/> ) 低温プローブ付 ( <input type="radio"/> ) 固体プローブ付 ( <input type="radio"/> ) サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間 1 : 平成 23 年 10 月 17 日 ~ 平成 23 年 10 月 24 日</p> <hr/> <p>利用装置④</p> <p>・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="radio"/> ) 700MHz、( <input type="radio"/> ) 800MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 900MHz  ( <input type="radio"/> ) 低温プローブ付 ( <input type="radio"/> ) 固体プローブ付 ( <input type="radio"/> ) サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間 1 : 平成 23 年 10 月 20 日 ~ 平成 23 年 10 月 28 日</p>
立体構造解析 パイプライン	<p>・ 発現確認 : 利用回数 0 回</p> <hr/> <p>・ フォールド判定 : 利用回数 0 回</p> <hr/> <p>・ 大量調製 : 利用回数 4 回</p> <hr/> <p>・ 構造決定 : 利用回数 2.75 回  (構造×1、帰属×1、パータベーション×2、緩和×3)</p>
利用満足度 (複数選択不可)	<p>( <input checked="" type="radio"/> ) 大いに満足、( <input type="radio"/> ) ほぼ満足、( <input type="radio"/> ) やや不満、  ( <input type="radio"/> ) 大いに不満</p>

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>立体構造解析パイプラインの無細胞系を利用して、研究対象の低温活性を持つ昆虫リゾチーム、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試料調製を行った。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大量調整が可能であった。前回のトライアルユースに引き続き、NMR 測定を行い、構造決定を完了した。</p> <p>また、得られた帰属結果を基に、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 CLEANEX 測定とその解析、昆虫リゾチームのグラム陰性菌に対する強い活性と関連があると考えられる LPS との相互作用について、化学シフトパータベーション実験を行った。</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>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り、前回のトライアルユースでの試料発現の成功と NMR 解析の結果を受け、さらに詳細な実験を進めた。</p> <p>立体構造解析の結果については、精密化を行い、PDB 登録を完了した。また、CLEANEX 測定の結果から、低温活性を有しないニワトリ卵白リゾチームについては、283K の低温領域で常温とは異なる挙動が確認されたのに対して、低温活性を有する昆虫リゾチームでは低温でも、常温と同様の挙動を示すことが確認された。また、LPS タイトレーションによる実験では、予備的結果ながら、リゾチームに対する LPS 結合を確認できた。</p> <p>今回の一連の測定と解析により、低温活性を有する昆虫リゾチームに特徴的な温度依存と揺らぎの関係を明らかにすることができたため、この点で当初目標の成果を十分に達成出来たとと言える。</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>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。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>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。</p>	
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>( <input checked="" type="radio"/> ) あり    :    ( <input type="radio"/> ) なし  「あり」の場合理由：特許出願等の検討中のため</p>	

理研 NMR 施設利用における感想	<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>前回のトライアルユースに続き、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。</p>
利用周辺環境に関する希望	<p>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。</p>
今後の利用形態の予定	<p><input type="checkbox"/> 再度本事業への申請を考えている。</p> <p><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。</p> <p><input type="checkbox"/> その他理研との共同研究等を考えている。</p> <p>具体的に：</p> <p><input type="checkbox"/> 未定</p>
今後期待するその他のサービス	<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)</p> <p><input type="checkbox"/> NMR 装置利用の技術的なサポート</p> <p><input type="checkbox"/> その他</p>

	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> ） （ <input checked="" type="radio"/> ）見た ： （ <input type="radio"/> ）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。