

理研NMR施設利用報告書  
(トライアルユース)

11-500-021

利用機関名	大陽日酸株式会社	
実施部署名	メディカル事業本部 SI 事業部	
実施責任者管理職名・氏名	阿部 佐知子	
実施部署所在地	〒142-8558 東京都品川区小山 1-3-26 東洋 Bldg.	
実施部署連絡先		
利用課題名	ウイルス天然変性蛋白質の安定同位体標識 NMR 解析	
利用目的・内容	ウイルスタンパク質の動的な揺らぎ構造が、ウイルスの持つ特徴である抗原性の多変性やパンデミックに関連する可能性を追求する。このタンパク質の持つ構造の性質に基づいて、有効なワクチンの開発を目的とする。	
利用実施時期及び期間	平成 23 年 5 月 13 日～平成 23 年 10 月 31 日  総利用日数：利用施設参照  当初計画どおり  (変更理由)	
利用施設	NMR 装置 (該当部分に○)	利用装置① ・ ( <input checked="" type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="radio"/> ) 700MHz、( <input type="radio"/> ) 800MHz、( <input type="radio"/> ) 900MHz ( <input checked="" 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 利用期間 1：平成 23 年 7 月 11 日～平成 23 年 7 月 24 日 利用期間 2：平成 23 年 7 月 15 日～平成 23 年 7 月 25 日

	<p>利用期間 3 : 平成 23 年 8 月 10 日</p> <p>利用期間 4 : 平成 23 年 8 月 15 日～平成 23 年 8 月 28 日</p> <p>利用期間 5 : 平成 23 年 8 月 15 日～平成 23 年 8 月 18 日</p> <p>利用期間 6 : 平成 23 年 8 月 29 日～平成 23 年 9 月 4 日</p> <p>利用期間 7 : 平成 23 年 8 月 29 日～平成 23 年 8 月 31 日</p> <p>利用期間 8 : 平成 23 年 9 月 5 日～平成 23 年 9 月 20 日</p> <p>利用期間 9 : 平成 23 年 10 月 19 日～平成 23 年 10 月 31 日</p> <p>利用期間 10 : 平成 23 年 10 月 27 日～平成 23 年 10 月 31 日</p>
	<p>利用装置②</p> <p>・ ( ) 600MHz、( ) 700MHz、( ) 800MHz、( ) 900MHz</p> <p>( ) 低温プローブ付 ( ) 固体プローブ付</p> <p>( ) サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間 1 : 平成 年 月 日～平成 年 月 日</p> <p>利用期間 2 : 平成 年 月 日～平成 年 月 日</p> <p>利用期間 3 : 平成 年 月 日～平成 年 月 日</p>
	<p>利用装置③</p> <p>・ ( ) 600MHz、( ) 700MHz、( ) 800MHz、( ) 900MHz</p> <p>( ) 低温プローブ付 ( ) 固体プローブ付</p> <p>( ) サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間 1 : 平成 年 月 日～平成 年 月 日</p> <p>利用期間 2 : 平成 年 月 日～平成 年 月 日</p> <p>利用期間 3 : 平成 年 月 日～平成 年 月 日</p>
	<p>立体構造解析 パイプ ライン</p> <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 7 回</p> <hr/> <p>・ 構造決定 : 利用回数 0 回</p>
<p>利用満足度 (複数選択不可)</p>	<p>( <input 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>

<p>成果の概要</p>	<p>実施内容</p>	<p>HIV タンパク質の p17 マトリックスタンパク質と p24 カプシドタンパク質の動的な構造解析のために、種々の 3次元 NMR スペクトルのシグナル帰属をさらに慎重におこなった。HSQC 上では、アミノ酸残基数以上の相関ピークが見られたので、一部のアミノ酸残基の領域には、2つの構造状態が存在し、その構造間で遅い交換をしている可能性が考えられた。この結果も含めて、溶液中のタンパク質の動的構造を、さらにシグナル帰属の結果に基づいて解析した。1) <math>R_2</math> と <math>R_1</math> の緩和実験、異核 NOE を測定し、ナノ秒からピコ秒オーダーの動的構造を解析した。2) HD 交換をおこない主鎖アミドプロトンの重水素溶媒からの交換を調べた。さらに CLEANEX の実験を行い、NMR 法による <math>H_2O</math> 分子のプロトンからのアミドプロトンへの交換を調べた。これらの結果より、溶媒への露出度、水素結合や 2次構造形成を解析した。両測定は相補的に行える利点があり、HD 交換は交換の遅い埋もれた構造部位を導き出すのに有用であるのに対して、CLEANEX は交換の速い分子表面プロトンの交換を調べるときに有用であった。3) NOESY と ROESY の実験をおこない、構造間の化学交換を調べた。</p>
<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>		<p>同じ HIV ウイルス由来の構造構築に関係するタンパク質である p17 と p24 の動的構造を解析した。HIV ウイルスの gag 遺伝子に含まれるこれらの二つのタンパク質遺伝子は、連続して並んでいる。しかしこの二つのタンパク質は、動的構造に関しては、全く異なる挙動を示した。p17 においては、通常のタンパク質と似て N 端と C 端において、<math>t_2</math> と <math>t_1</math> 緩和実験や異核 NOE 実験で示される速い時間スケールの揺らぎ構造が見られたが、p24 においては、N 端と C 端のみならず、配列上中央部の領域において、速い時間スケールの揺らぎ構造が存在していた。p24 では、中性領域の条件下においても、シグナルの重なりが多く観測されたが、この天然変性の領域が、揺らぎ運動を起こしていると考えられた。この p24 では、中性領域よりも、やや弱酸性領域において、よりよいシグナルの分散が見られたことより、至適 pH が弱酸性に片よっている可能性がある。</p> <p>一方 p17 では、一つのアミノ酸に対応するシグナルが複数個観測される遅い 2 状態の交換は観測されなかったが、p24 では C 端領域のタグ部分において、2 状態間の遅い交換が見られた。この遅い交換は、プロリンのシスとトランスの異性化に関連する可能性があると思われる。</p>

<p>今後の展開、課題</p>	<p>本課題で用いた p17 と p24 タンパク質を対象として、緩和実験 <math>T_1</math> と <math>T_2</math> や異核 NOE 実験によって得られる速い時間領域の動きと、HD 交換などの秒時間の遅い時間領域の動き以外に、その中間の時間領域に対応するナノ秒からミリ秒の時間領域の動きを、<math>R_2</math> 緩和ディスパージョン法を用いて今後は解析したい。そのことにより、連続した広くの時間領域の揺らぎを、まとめて議論することが可能となる。</p> <p>さらに他のウイルスタンパク質においても、このような天然変性の揺らぎ領域が、生理的な条件下で存在しているのかを検証していきたい。感染性の高い、パンデミックのウイルスタンパク質の一般的な構造形成や多形性の特性にせまることが今後の課題である。</p> <p>ウイルスタンパク質の抗原性の多変性が、一般にピコ秒からミリ秒時間領域の速い揺らぎ運動のタンパク質の多形性と関連するのか、またプロリンのシスとトランス異性化やシステインのジスルフィド結合の架け替えなどに代表される遅い構造変化に関連するのかを考えて、今後の研究で明らかにしていきたい。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>ウイルス天然変性蛋白質の持つユニークな特徴を明らかにすることで、新しいワクチン開発等の産業にも波及効果を及ぼすことが期待される。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>( ) あり : (○) 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>タンパク質の調整から、サンプル調整、そして、複雑なシグナル帰属用の NMR 測定や動的構造解析用の NMR 測定まで、最初の部分からデータ取得まで、すべてをお願いでき、丁寧に教えて頂きました。通常、かなりの研究費を設備に投資して初めてできる実験が、ほとんど依頼で無償できました。実際に援助して頂きました費用は、わかりませんが、自社で機材を購入することなどは、全く不可能ですので、この機会は大変に有難く、今後の自社製品開発に大変に役立ちました。</p> <p>要望としては、最近になってトライアルコースの期間が半年に短縮されましたが、やはり一年位の期間がないと、一通りの実験データ取得には、やや困難だと思われまます。</p>

利用周辺環境に関する希望	特にありません。
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。 <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
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) <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
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 type="checkbox"/> 見た : <input type="checkbox"/> 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。