

理研NMR施設利用報告書

(トライアルユース)

11-500-022

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	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 23 年 8 月 1 日～平成 24 年 3 月 30 日 総利用日数：6 当初計画どおり・当初計画変更 (変更理由) 施設利用者の急増により計画が遅延したために、課題締め切りの延長をして頂いた。	
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
		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
		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 3 回 ・ フォールド判定 : 利用回数 0 回 ・ 大量調製 : 利用回数 2 回 ・ 構造決定 : 利用回数 0 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	

<p>成果の概要</p>	<p>実施内容</p>	<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>前課題でヒトチロシナーゼの発現を検討したが、検討したいずれの条件でも発現が認められず、発現が認められたものも不溶性またはわずかに可溶性であり、酵素活性も認められないことから、今後の実験を遂行するには改善する必要がある。そこで、本課題では不溶性あるいはわずかに可溶性に発現されたチロシナーゼが活性を有する状態で、大量に得られるよう検討を加えた。また、これまで活性が全く確認されていないため、活性測定の陽性コントロールとして、大腸菌での発現系で、活性が認められている放線菌のチロシナーゼを無細胞系で発現させ、その酵素活性を測定した。</p> <p>まず、S-S結合を考慮し、酸化還元緩衝液中で窒素置換し合成を行った。また、活性中心に銅が配位しているため、活性測定時のみではなく、銅を添加した状態で発現を試みた。さらに、発現された酵素活性が、発現に対して負の影響がある可能性を排除するために、コウジ酸やアルブチンのような阻害物質を添加した状態で発現を試みた。</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>※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>放線菌のチロシナーゼは、一部不溶性に発現されるものの、十分な可溶性タンパク質として発現された。また、得られた可溶性タンパク質はチロシナーゼ活性を有していたことから、酵素活性のアッセイ系には問題がないことが明らかとなった。</p> <p>発現条件の検討においては、比較的還元性の高い条件では、目的タンパク質と思われるバンドが、不溶性産物として SDS-PAGE により確認された。より酸性的な条件では、産物は不溶性産物においてもほとんど検出されなかった。また、銅の添加による改善は認められなかった。また、阻害物質を添加しても、その発現は変化せず、チロシナーゼの酵素活性が発現に対して影響している可能性も否定された。</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>色々な条件において、ヒトチロシナーゼの発現を試みたが、いずれの条件においても活性を有するチロシナーゼは得ることができなかった。</p> <p>不溶性タンパク質として得られたタンパク質のリフォールディングの検討なども行っているが、今のところ活性は認められていない。また、ヒトチロシナーゼの活性には翻訳後修飾が必要であるかどうか不明であり、昆虫細胞や哺乳類の細胞を用いた発現系を構築する必要があるのかもしれない。</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。また、進捗状況に応じて新たな提案を頂き、当初考えていた計画以上の検討を行うことができました。</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>()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： (O)未定</p>
<p>今後期待するその他のサービス</p>	<p>() 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 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>(http://kyoyonavi.mext.go.jp/) (O) 見た : () 見ていない 感想等： とても、実用性のある試みだと思います。もっと色々な分野で広がることを期待します。</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。