

理研NMR施設成果非占有利用報告書

12-200-061

平成 25 年 11 月 29 日

利用機関名		富山大学
実施部署名		大学院医学薬学研究部構造生物学
実施責任者管理職名・氏名		教授 / 水口峰之
実施部署所在地		富山市杉谷 2630 番地
利用課題名		セリンラセマーゼを標的とした神経変性疾患治療薬の開発
利用実施時期及び期間		平成 25 年 8 月 29 日～平成 25 年 10 月 16 日 当初計画どおり 当初計画変更 (変更理由)
利用施設	立体構造解析 パイプライン	・ 発現確認 : 利用回数 1 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	大腸菌のセルフリー合成を用いて、D-セリン合成酵素であるセリンラセマーゼの発現確認を行った。コンストラクトは、C 末端に His タグを持つもの、持たないものの 2 種、および N 末のタグが異なる 6 種（可溶性促進効果のあるタグなど）を設計した。また、セリンラセマーゼを発現するために以下の工夫をした。 ・ 合成反応液に補酵素（PLP）を添加した。 ・ 合成反応液に還元剤 DTT を過剰量（10 mM）添加した。 (Cys 残基の酸化による不溶化を抑制するため) ・ 合成時間を短縮した（終夜→3 h）。 (不溶化を抑制するため) ・ PEG 有りと無しの条件を検討した。 (PEG は合成反応液に通常含まれる。) ・ 可溶性促進タグを切断するプロテアーゼを合成時に加えた反応を検討した。（タグを取り除いた後の物性を予測するため）

	本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較	PEG 有り条件では、検討した全ての条件で不溶性であった。PEG 無し条件でもほぼ同様だったが、N11_SUMO タグがついた状態では、わずかながら可溶性に発現が確認できた。しかし、同コンストラクトで、タグを切断するプロテアーゼを発現時に添加した条件では、目的タンパク質のバンドは確認できなかった。以上より、セリンラセマーゼは不溶性が高く、NMR 解析に必要な量を得ることが困難であることがわかった。 当初目標では、セリンラセマーゼの $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識体を作成し、NMR 測定を行う予定であった。
	今後の展開、課題	本課題の目的は、高磁場 NMR 装置を用いて、セリンラセマーゼと候補化合物の相互作用を検出し、リード化合物のスクリーニングに活用することである。今回、セリンラセマーゼの発現を確認できなかったため、酵母や昆虫細胞など他の発現系の利用を検討する必要がある。
成果公開延期の希望の有無	() あり : () なし 「あり」の場合理由 :	
利用における感想 (改善要望等を含む)	大腸菌のセルフリー合成を用いて、多数のコンストラクト、多数の反応条件でタンパク発現を検討していただいた(合計で 32 条件)。残念ながら可溶性画分に発現を確認できなかったが、多数の条件を試していただき感謝している。	
利用周辺環境に関する希望	特にありません。メールでの打ち合わせのみで利用させていただき、直接 NMR 施設に行く必要がなく助かりました。	
今後の利用形態の予定	() 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 本課題とは別の研究で、共同研究を提案させていただきたいと考えている。	
今後期待するその他のサービス	() 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	

その他	（上記の項目以外でご意見等お願いします。） 特にありません。