

理研 NMR 施設利用報告書
(トライアルユース)

12-500-027

平成 25 年 7 月 8 日

利用機関名	REC マテリアルズ (株)	
実施部署名	営業開発部	
実施責任者管理職名・氏名	部長 / 丸山 渉	
実施部署所在地	横浜市保土ヶ谷区常盤台 1 8 - 1 - 2 1 8	
実施部署連絡先		
利用課題名	NMR によるウイルス蛋白質の動的構造解析	
利用目的・内容	薬剤開発のターゲットとなる天然変性蛋白質の研究に、安定同位体の利用の有用性を示し、これからの創薬のために、安定同位体 NMR を製薬業界に産業的に広めていくことを、本研究の目的とする。	
利用実施時期及び期間	平成 24 年 4 月 16 日～平成 24 年 9 月 30 日 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 ・ (☒) 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 24 年 4 月 23 日～平成 24 年 4 月 30 日 利用期間 2 : 平成 24 年 5 月 14 日～平成 24 年 5 月 20 日 利用期間 3 : 平成 24 年 6 月 4 日～平成 24 年 6 月 10 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 24 年 7 月 23 日～平成 24 年 7 月 29 日 利用期間 2： 平成 24 年 8 月 13 日～平成 24 年 8 月 26 日 利用期間 3： 平成 24 年 9 月 3 日～平成 24 年 9 月 17 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 24 年 5 月 7 日～平成 24 年 5 月 20 日
	利用装置④ ・ (☐)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 24 年 7 月 30 日～平成 24 年 8 月 5 日
	利用装置⑤ ・ (☐)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 24 年 4 月 16 日～平成 24 年 4 月 22 日 利用期間 2： 平成 24 年 6 月 11 日～平成 24 年 6 月 17 日 利用期間 3： 平成 24 年 6 月 12 日～平成 24 年 6 月 17 日 利用期間 4： 平成 24 年 7 月 2 日～平成 24 年 7 月 8 日 利用期間 5： 平成 24 年 7 月 23 日～平成 24 年 8 月 5 日 利用期間 6： 平成 24 年 9 月 24 日～平成 24 年 9 月 30 日
	利用装置⑥ ・ (☐)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 24 年 7 月 17 日～平成 24 年 7 月 22 日 利用期間 2： 平成 24 年 8 月 20 日～平成 24 年 8 月 26 日

		利用装置⑦ ・ ()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24年4月16日～平成24年4月30日 利用期間2： 平成24年5月7日～平成24年5月13日 利用期間3： 平成24年6月25日～平成24年7月1日
		利用装置⑧ ・ ()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24年5月14日～平成24年5月20日 利用期間2： 平成24年6月11日～平成24年6月17日
	立体構造解析 パイプ ライン	・ 発現確認 ： 利用回数 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	アルファシヌクレインを天然変性蛋白質のモデル蛋白質として考え、これまで研究を行ってきた。本研究では、新しい天然変性蛋白質を求めて、まずスクリーニングをおこなってきた。蛋白質の実験を行える条件を満たす安全性から観点や、実際には蛋白質の可溶性発現や発現量の観点から、2つの新しい天然変性蛋白質を用いて研究を進めることに決定した。 牛由来の蛋白質：膜結合蛋白質であり膜のない状態では、通常構造がない。機能としては膜との結合に関わる蛋白質（fusion protein）であり、膜と相互作用してヘリックス構造ができる。アルファシヌクレインとこの点では似た性質である。 はしかが蔓延している社会であるが、はしかウイルスの核蛋白質（nucleoprotein）のC端ドメインには通常構造がなく、リン酸化蛋白質（phospho-protein）との結合により、相互作用して折りたたまれて構造ができる。特に創薬研究を目指した場合、後者の研究は有効である。 本期間は、これら蛋白質の HSQC スペクトルを測定し、シグナルが中央部に集まっていることを確認した。アルファシヌクレインのように温度をあげてシグナル強度が変化するかを確かめ、また pH を変化させても、凝集などが起こらないことを確認した。
	本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較	まず次の期間に研究を行う蛋白質を選ぶことができた。その点で重要な成果を得たといえる。アルファシヌクレインで得られた結果が、天然変性蛋白質に共通する事象なのか、あるいは、アルファシヌクレインにだけ、当てはまるものなのか、これら二つの蛋白質と比較しながら研究を行っていきたい。 この新しい2つの蛋白質とも、天然変性している蛋白質なので、解析に必要なほどに、シグナルが分散して観測されるかの不安があった。幸いこの条件は満たしていた。 本期間では、シグナル帰属のための簡単な3次元スペクトル HNCO などの予備実験をおこなった。また、水のプロトンと蛋白質のアミドプロトンの交換をみる CLEANEX-PM の予備実験を行った。 アルファシヌクレインは、比較的残存構造ができている天然変性蛋白質であるが、それゆえに、R2 緩和分散実験によるマイナー成分の解析ができなかった。マイナー成分がわかれば、隠れている結合型が見えるかもしれないので、面白い研究に発展できる。本蛋白質においてその可能性を試そうとしているが、まだはっきりとはわからない。

	今後の展開、課題	天然変性蛋白質の動的構造解析のために、私はシヌクレインの系で確立した CLEANEX-PM の系を、この系で拡大しておこなっていくことを、本研究の目的とする。アミドプロトンと水との交換時間を変化させたり、pH を何点も変化させて測定することによって、水酸基イオン濃度と交換速度定数が比例関係にあること、交換時間と交換に伴う pH 依存シグモイドカーブの pKa が比例関係にあることを、ひとつひとつ示していくことが今後の次期の課題となる。可能ならば、アルファ-シヌクレインでの研究では示せなかった EX1 モードについても、はっきりさせていきたい。 R2 緩和分散法は、マイナーに存在する結合型などの形を観測できる優れた方法であり、天然変性の陰に隠れているマイナー構造の予備軍を明らかにできる。変性状態のシグナルを介して、構造形成のマイナー成分が見えるのかは未だ検討中であり、次期の課題である。 蛋白質の発現に関しては、大変に成功したと思っている。今後は、NMR 実験に専念できる。アルファ-シヌクレインの実験系では問題となったように、必要ならばプロトンではなく炭素のシグナルを介して、情報を得ることも試みていく。
社会・経済への波及効果の見通し		創薬における NMR 研究の有用性が、明らかになっていくであろう。
成果公開延期の希望の有無		() あり : (○) なし 「あり」の場合理由：

理研 NMR 施設利用における感想	大変によかった。
利用周辺環境に関する希望	特に無し。
今後の利用形態の予定	☐ 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： ☐ 未定
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
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	(http://kyoyonavi.mext.go.jp/) ☐ 見た : ☐ 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。) 特に無し
-----	-------------------------------

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。