

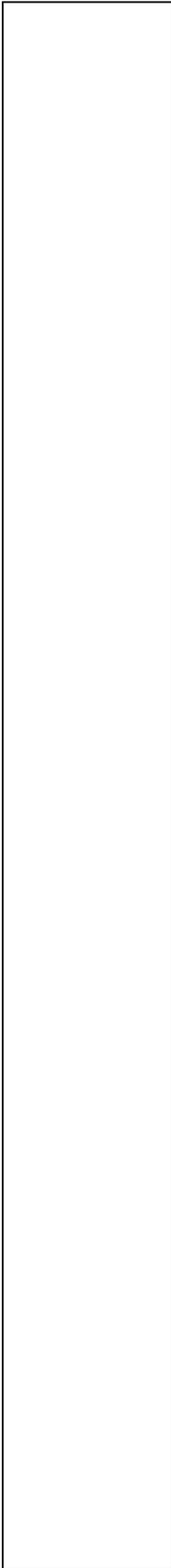
理研NMR施設利用報告書  
(トライアルユース)

12-500-028

平成 25 年 7 月 9 日

利用機関名	財団法人野口研究所	
実施部署名	研究部	
実施責任者管理職名・氏名	主任研究員 山ノ井孝	
実施部署所在地	東京都板橋区加賀 1-8-1	
実施部署連絡先		
利用課題名	抗インフルエンザ薬の開発を目指した糖鎖-レクチンの分子間相互作用解	
利用目的・内容	鶏卵由来シアログリコペプチド (SGP) を用いたインフルエンザ感染阻害剤開発の一環として、本利用ではSGPのインフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)抗原(宿主細胞への感染タンパク質)への結合特性をNMRで明らかにすることにした。	
利用実施時期及び期間	平成 24 年 4 月 2 日~平成 24 年 10 月 31 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 ・( <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 24 年 4 月 2 日~平成 24 年 4 月 15 日 利用期間 2 : 平成 24 年 5 月 21 日~平成 24 年 6 月 3 日

	<p>利用期間 3 : 平成 24 年 5 月 28 日～平成 25 年 6 月 17 日          利用期間 4 : 平成 24 年 7 月 17 日～平成 24 年 8 月 13 日          利用期間 5 : 平成 24 年 7 月 30 日～平成 24 年 8 月 12 日          利用期間 6 : 平成 24 年 8 月 20 日～平成 24 年 9 月 2 日          利用期間 7 : 平成 24 年 8 月 27 日～平成 24 年 9 月 17 日          利用期間 8 : 平成 24 年 10 月 1 日～平成 24 年 10 月 22 日</p>
<p>利用装置②          ・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="checkbox"/> ) 700MHz、( <input type="checkbox"/> ) 800MHz、( <input type="checkbox"/> ) 900MHz          ( <input type="radio"/> ) 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 24 年 4 月 9 日～平成 24 年 4 月 15 日          利用期間 2 : 平成 24 年 4 月 23 日～平成 24 年 5 月 6 日          利用期間 3 : 平成 24 年 5 月 1 日～平成 24 年 5 月 20 日          利用期間 4 : 平成 24 年 6 月 11 日～平成 24 年 6 月 17 日          利用期間 5 : 平成 24 年 7 月 17 日～平成 24 年 7 月 22 日          利用期間 6 : 平成 24 年 7 月 30 日～平成 24 年 8 月 12 日          利用期間 7 : 平成 24 年 9 月 18 日～平成 24 年 9 月 23 日</p>	
<p>利用装置③          ・ ( <input type="checkbox"/> ) 600MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 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 24 年 4 月 9 日～平成 24 年 4 月 15 日          利用期間 2 : 平成 24 年 5 月 1 日～平成 24 年 5 月 27 日          利用期間 3 : 平成 24 年 6 月 4 日～平成 24 年 6 月 10 日          利用期間 4 : 平成 24 年 6 月 18 日～平成 24 年 6 月 24 日          利用期間 5 : 平成 24 年 7 月 2 日～平成 24 年 7 月 29 日          利用期間 6 : 平成 24 年 8 月 13 日～平成 24 年 8 月 19 日          利用期間 7 : 平成 24 年 9 月 3 日～平成 24 年 10 月 22 日</p>	
<p>利用装置④          ・ ( <input type="checkbox"/> ) 600MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 700MHz、( <input type="checkbox"/> ) 800MHz、( <input type="checkbox"/> ) 900MHz          ( <input checked="" type="radio"/> ) 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 24 年 4 月 9 日～平成 24 年 4 月 23 日</p>	



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 9 日～平成 24 年 4 月 15 日
- 利用期間 2 : 平成 24 年 4 月 9 日～平成 24 年 4 月 15 日
- 利用期間 3 : 平成 24 年 4 月 9 日～平成 24 年 4 月 15 日
- 利用期間 4 : 平成 24 年 4 月 23 日～平成 24 年 5 月 13 日
- 利用期間 5 : 平成 24 年 5 月 7 日～平成 24 年 5 月 17 日
- 利用期間 6 : 平成 24 年 5 月 21 日～平成 24 年 6 月 3 日
- 利用期間 7 : 平成 24 年 6 月 18 日～平成 24 年 7 月 1 日
- 利用期間 8 : 平成 24 年 7 月 17 日～平成 24 年 7 月 22 日
- 利用期間 9 : 平成 24 年 8 月 6 日～平成 24 年 8 月 19 日
- 利用期間 10 : 平成 24 年 8 月 13 日～平成 24 年 8 月 26 日
- 利用期間 11 : 平成 24 年 9 月 10 日～平成 24 年 9 月 23 日
- 利用期間 12 : 平成 24 年 10 月 9 日～平成 24 年 10 月 14 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 4 月 9 日～平成 24 年 4 月 15 日
- 利用期間 2 : 平成 24 年 4 月 9 日～平成 24 年 4 月 15 日
- 利用期間 3 : 平成 24 年 4 月 19 日～平成 24 年 5 月 6 日
- 利用期間 4 : 平成 24 年 4 月 23 日～平成 24 年 4 月 30 日
- 利用期間 5 : 平成 24 年 5 月 28 日～平成 24 年 6 月 3 日
- 利用期間 6 : 平成 24 年 6 月 5 日～平成 24 年 7 月 22 日
- 利用期間 7 : 平成 24 年 7 月 25 日～平成 24 年 8 月 12 日
- 利用期間 8 : 平成 24 年 8 月 17 日～平成 24 年 8 月 26 日
- 利用期間 9 : 平成 24 年 9 月 3 日～平成 24 年 9 月 30 日
- 利用期間 10 : 平成 24 年 10 月 9 日～平成 24 年 10 月 14 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 2 日～平成 24 年 5 月 10 日

	利用期間 2 : 平成 24 年 6 月 4 日～平成 24 年 6 月 25 日 利用期間 3 : 平成 25 年 6 月 11 日～平成 24 年 6 月 24 日 利用期間 4 : 平成 24 年 6 月 26 日～平成 24 年 7 月 16 日 利用期間 5 : 平成 24 年 8 月 13 日～平成 24 年 8 月 19 日 利用期間 6 : 平成 24 年 8 月 27 日～平成 24 年 9 月 9 日 利用期間 7 : 平成 24 年 9 月 3 日～平成 24 年 9 月 9 日 利用期間 8 : 平成 24 年 9 月 24 日～平成 24 年 10 月 8 日	
	利用装置⑧ ・ ( ) 600MHz、( ) 700MHz、( ) 800MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 900MHz ( <input checked="" type="radio"/> ) 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 1 日～平成 24 年 5 月 6 日 利用期間 2 : 平成 24 年 6 月 4 日～平成 24 年 6 月 10 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 18 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、( <input checked="" type="radio"/> ) 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><u>1) NMR測定サンプル</u></p> <p>SGPの他に、糖鎖はSGPの部分構造あるいは類似構造を持つ、Neu<math>\alpha</math>2<math>\rightarrow</math>6Gal<math>\beta</math>pMP、Neu<math>\alpha</math>2<math>\rightarrow</math>3Gal<math>\beta</math>pMP、Neu<math>\alpha</math>2<math>\rightarrow</math>3Gal<math>\beta</math>1<math>\rightarrow</math>4Glc<math>\beta</math>pNP、Neu<math>\alpha</math>2<math>\rightarrow</math>6Gal<math>\beta</math>1<math>\rightarrow</math>4GlcNAc<math>\beta</math>pMP、Neu<math>\alpha</math>2<math>\rightarrow</math>6Gal<math>\beta</math>1<math>\rightarrow</math>3GlcNAc<math>\beta</math>pMP、Neu<math>\alpha</math>2<math>\rightarrow</math>6GalNAc<math>\alpha</math>pMPを用いた。</p> <p>HAの他に、HAと相同性が高い類似の糖鎖認識能を持つニホンニワトコレクチン(SSA)を用いた。</p> <p><u>2) 糖鎖-タンパク質の結合特性の解析</u></p> <p>HAは高価であるため、貴研究所の立体構造解析パイプラインを利用し、NMR測定に十分な量の発現を目指した。</p> <p>前回のトライアルユース利用では、SGPが分子レベルにおいてSSAと分子間相互作用していることが解明された。今回は、より微視的な解析として、SGPを構成している各糖分子及び各アミノ酸レベルでのHAとの分子間相互作用を明らかにして、SGPのHAへの選択的結合特性を明らかにすることとした。SGPの<sup>1</sup>H NMRは複雑なスペクトルを与えることから、解析が容易な<sup>13</sup>C NMRに基づく測定法を利用し、主にSTD-SHQC法を用いた測定を検討した。</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>本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較</p>	<p><u>HAの大量発現</u></p> <p>貴研究所・立体構造解析パイプラインの方々に検討を重ねて頂いたが、大量発現による分取は困難であることが判った。(HAは市販品を用いた。)</p> <p><u>STD-SHQC法測定とその解析</u></p> <p>5mmのシゲミ管中、SGPを24mM、SSAを0.24mMの濃度に調整し、積算回数を128回以上にすることで分解能が高く、解析可能なSTD-SHQCスペクトルが得られた。市販で調達可能なHA量では良好なSTD-SHQCスペクトルは得られなかったが、STD NMR測定は達成された。</p> <p>SGPの分岐構造の両末端のNeu<math>\alpha</math>2<math>\rightarrow</math>6Galが強く分子間相互作用していることがわかった。この二糖はSSAの糖鎖エピソードである。SGPの分岐構造によるSSA認識の低下は見られず、むしろこの分岐構造がSSAの結合性増強に寄与していることが強く示唆された。当初の予想通りにSGPのNeu<math>\alpha</math>2<math>\rightarrow</math>6GalユニットがSSAへの特異的結合性を示すことが明らかになった。</p> <p>また、SGPの分岐構造部分の一部の糖と、ペプチド鎖の一部にも弱い分子間相互作用が見られ、SGPの一部がSSAに対する非特異的結合性要因として作用するもこともわかった。</p>

	<p>今後の展開、課題</p>	<p>SGPのSSAへの非特異的結合性の要因は、SGPの阻害剤としての選択性を低下させる原因となる。SGPの阻害剤利用では、この非特異的結合を低下させるような工夫が必要である。</p> <p>SGPの分岐構造による Neu<math>\alpha</math>2<math>\rightarrow</math>6Gal ユニットがSSAへの結合性増強に寄与していることから、SGPを集積化利用することで、SSAへの結合選択性が高く、かつより強い結合特性を持たせることが可能であると推測される。これは、“糖鎖クラスター効果”と言われている糖鎖工学の革新的な技術開発に繋がると考えられる。</p> <p>これらを踏まえて、今後はSGPをフィルター等での利用によるインフルエンザ拡散防止剤や、医薬品等としてのインフルエンザ感染阻害剤創製に繋がる開発を模索していきたいと考えている。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>現在も猛威を振るっているトリインフルエンザウイルスの変異によるヒトへの感染を抑えるには、HA 阻害効果を持つ抗インフルエンザ薬の開発が急務である。鶏卵由来の糖鎖が HA 阻害効果を持つ可能性が高いことが明らかにされたことは、抗インフルエンザ薬の開発に期待が持てると確信している。</p>	
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>( ) あり : ( O ) なし</p> <p>「あり」の場合理由 :</p>	
<p>理研 NMR 施設利用における感想</p>	<p>高周波で、クライオプローブ付の NMR 装置で、連続数日も掛けた測定ができたおかげで、開発を進展させることができた。また、NMR測定を担当して頂いた研究員の方には、NMR測定技術、サンプル調製のノウハウを懇切丁寧にご教授頂き、大変に勉強になった。さらに、こちらの要望に応じていただき、研究員の方も殆ど測定したことない特殊手法について、色々調べていただき、満足いく結果を残すことができた。また、HA作成では、パイプラインの研究員の方々にも、多大なご尽力を頂いた。貴理化学研究所のNMR施設の皆様に深く感謝致します。</p> <p>今後も宜しくお願い申し上げます。</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： 研究者に対して、判りやすく便利だと思いました。
その他	(上記の項目以外でご意見等お願いします。) 今後とも宜しく願い申し上げます。

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。