

理研 NMR 施設利用報告書
(トライアルユース)

12-500-029

平成 25 年 7 月 2 日

利用機関名	株式会社エルエイシステムズ
実施部署名	
実施責任者管理職名・氏名	大塚 昌延
実施部署所在地	東京都台東区上野 1-11-5 時計会館ビル 1 階
実施部署連絡先	
利用課題名	長距離情報を利用したマルチドメインタンパク質の構造解析手法の開発
利用目的・内容	真核生物のタンパク質は、しばしば複数のドメインが柔軟なリンカーによって連結されたマルチドメインで構成されている。例えば、活性を担うドメインと制御ドメインなどの複数のドメインから構成され、多くの場合、ドメイン間の相互作用は弱く、複雑な活性制御が行われる。これらの蛋白質の全長ではドメイン間のリンカーが柔軟である、またドメイン間の相互作用が弱く曖昧であることから、結晶化が容易でないことが多い。 本研究では、常磁性緩和効果や常磁性シフト等の長距離情報に基づいた NMR によるマルチドメインタンパク質の構造解析手法の確立を目指している。その際、理研の高磁場 NMR によって得られた高品質なデータを用いて、弊社のソフト NMRPipe のピークピッキング機能やマクロを使用することで解析を行い、さらに常磁性緩和効果や常磁性シフトを構造情報とする立体構造計算を弊社のソフト CYANA を用いて行う。またこれらの有用性を評価し、ソフトの改良へとつなげる。

利用実施時期及び期間		平成 24 年 10 月 23 日～平成 25 年 3 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 ・ () 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 10 月 23 日～平成 24 年 11 月 4 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 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	※実際にを行った作業の概要について記載してください。 具体的なマルチドメインタンパク質の解析対象として、首都大学東京理工学研究科三島正規准教授らによって調製された Protein kinase C (PKC)を用いた。 本測定（実施）では、マルチドメインの中でも、部分構造として構造未知である C1A ドメインの立体構造決定を、まず行った。そのため C1A ドメインの各種 3 次元 NOESY を測定した。PKC の C1A ドメインは大腸菌の発現系では不溶性を示し、従来は調製困難であったが、変異を導入することで、低濃度ながら可溶化に成功している。 これらの測定データを、弊社の解析ソフトである NMRPipe を用いて解析した。ピークピッキングアルゴリズム nLinLS 等の機能やマクロを使用し、これらを評価した。さらに得たデータで、プログラム CYANA を用いて構造計算を行った。
	本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較	※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。 測定した変異体 C1A ドメインは、低濃度の試料しか得られなかったが、理研の低温プローブ付き高磁場(800MHz)NMR を用いて各種 3 次元 NOESY の測定を行うことで、良い質のデータを得ることができた。 これらを NMRPipe を用いて解析し、プログラム CYANA を用いて構造計算を行い、C1A ドメインの立体構造を決定することに成功した。 NMRPipe の機能を十分検証するには今回の実施測定から得られたデータだけでなく、さらに今後の多数のデータが必要であった。 しかし今回の測定と構造計算によって、C1A ドメインの立体構造情報を得たことで、目標であるマルチドメイン状態での解析へ大きく前進した点は非常に重要な成果であった。

	今後の展開、課題	※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。 今後はマルチドメインである状態（できれば全長）での PKC を用いて長距離情報の測定を行い、常磁性緩和効果や PCS を NMRPipe を用いて解析して、マルチドメインである状態での構造計算に取り組み、これらの手法における NMRPipe や CYANA の有用性を、分析、評価する。
社会・経済への波及効果の見通し		本課題で得られたノウハウをもとに他のマルチドメインタンパク質の構造解析へと展開する。また NMRPipe の有効性の評価に基づいて、開発者へのフィードバックを行うことで、さらに NMRPipe の高機能化を図る。
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		※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。 理研 NMR 施設の利用ではサポート体制の充実にとても感謝しています。 設置時は最新であった NMR 分光機も、そろそろ時代遅れになりつつあると感じます。1 台から数台でも結構ですので、最新の分光機を備えた NMR があると、利用の幅がより広がると思います。（より線形的な応答、簡便なパルス設定、自由なルーティング、Non uniform sampling への対応などが期待できます）
利用周辺環境に関する希望		特になし。

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 特になし。
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。