

理研NMR施設利用報告書  
(トリアルユース)

12-500-030

平成 25 年 7 月 22 日

利用機関名	メルク株式会社	
実施部署名	メルクミリポア事業本部	
実施責任者管理職名・氏名	島尾 優子	
実施部署所在地	東京都目黒区下目黒 1-8-1	
実施部署連絡先		
利用課題名	タンパク質安定化剤の安定化メカニズムの解析	
利用目的・内容	<ul style="list-style-type: none"> <li>・タンパク質安定化剤である NDSB 類およびその類似化合物 COS がタンパク質を安定化するメカニズムを解析する.</li> <li>・不安定なタンパク質・ペプチド複合体の構造について、重水素化が可能な COS の存在下で解析する.</li> </ul>	
利用実施時期及び期間	<p>平成 24 年 11 月 19 日～平成 25 年 3 月 31 日 総利用日数：92 日</p> <p style="text-align: center;">当初計画変更 (変更理由) 当初予想よりもサンプル数が増えたため</p>	
利用施設	NMR 装置 (該当部分に○)	<p>利用装置①</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ( <input checked="" type="checkbox"/> ) 600MHz、( <input type="checkbox"/> ) 700MHz、( <input type="checkbox"/> ) 800MHz、( <input type="checkbox"/> ) 900MHz</li> <li>( <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</li> </ul> <p>利用期間 1：平成 24 年 12 月 10 日～平成 24 年 12 月 16 日</p>

	<p>利用期間 2 : 平成 25 年 1 月 15 日～平成 25 年 1 月 24 日</p>
	<p>利用装置②</p> <p>・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="radio"/> ) 700MHz、( <input type="radio"/> ) 800MHz、( <input type="radio"/> ) 900MHz  ( <input type="radio"/> ) 低温プローブ付 ( <input type="radio"/> ) 固体プローブ付 ( <input type="radio"/> ) サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間 1 : 平成 24 年 11 月 26 日～平成 24 年 12 月 5 日  利用期間 2 : 平成 24 年 12 月 25 日～平成 25 年 1 月 14 日  利用期間 3 : 平成 25 年 3 月 19 日～平成 25 年 3 月 24 日</p>
	<p>利用装置③</p> <p>・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 700MHz、( <input type="radio"/> ) 800MHz、( <input type="radio"/> ) 900MHz  ( <input type="radio"/> ) 低温プローブ付 ( <input type="radio"/> ) 固体プローブ付 ( <input type="radio"/> ) サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間 1 : 平成 24 年 11 月 26 日～平成 24 年 12 月 2 日  利用期間 2 : 平成 25 年 1 月 15 日～平成 25 年 2 月 3 日</p>
	<p>利用装置④</p> <p>・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="radio"/> ) 700MHz、( <input type="radio"/> ) 800MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 900MHz  ( <input type="radio"/> ) 低温プローブ付 ( <input type="radio"/> ) 固体プローブ付 ( <input type="radio"/> ) サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間 1 : 平成 24 年 11 月 19 日～平成 24 年 11 月 25 日  利用期間 2 : 平成 25 年 2 月 4 日～平成 25 年 2 月 17 日</p>
立体構造解析 パイプ ライン	<p>・ 発現確認 : 利用回数 回</p> <p>・ フォールド判定 : 利用回数 回</p> <p>・ 大量調製 : 利用回数 回</p> <p>・ 構造決定 : 利用回数 回</p>
利用満足度 (複数選択不可)	<p>( <input type="radio"/> ) 大いに満足、( <input type="radio"/> ) ほぼ満足、( <input type="radio"/> ) やや不満、  ( <input type="radio"/> ) 大いに不満</p>

成果の概要	実施内容	<p>1. 不安定で凝集しやすいタンパク質である aFGF について、NDSB による安定化効果が「ペプチド結合の溶解度低下による水素結合形成促進」によるものかを、アミド NH と水との交換速度を CLEANEX-PM で測定することにより解析した。</p> <p>2. 不安定で凝集しやすい膜タンパク質複合体について、安定化剤である COS の存在下で構造解析した。</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>1. NDSB がタンパク質を安定化する原因として、(1) ペプチド結合の溶解度低下による水素結合形成促進、(2) タンパク質分子全体のコンパクト化、(3) 疎水性パッチのマスクなどの効果が各種物理化学的実験から得られていた。aFGF は NDSB-195 の添加により二次構造とループとの接合部位のシグナルが特異的に摂動を受けることから、(1) の効果の可能性が高いと予想し、アミド NH と水との交換速度を CLEANEX-PM で測定することにより解析した。</p> <p>その結果、シグナルの摂動効果を最も受けやすい部分（C末端の <math>3_{10}</math> ヘリックスと <math>\beta</math> ストランドを繋ぐループ）が最も強く交換速度が低下した。このことは、当初の予想を裏付けるものである。</p> <p>また、タンパク質安定化剤として古くから知られている TMAO はかえって aFGF を不安定にした。このことは NDSB の有用性を示している。</p> <p>2. 膜タンパク質である m4 ムスカリン性レセプター (m4R) の細胞内第三ループC末端側に相当する部分ペプチド m4I3C(14) と m4R のターゲットである <math>G\alpha_{i1}</math> との相互作用を解析した。</p> <p>m4I3C(14) は単独でもアミロイド化しやすいが、1 M の重水素化 COS の添加により長期間安定に存在した。また、m4I3C(14) に <math>G\alpha_{i1}</math> を加えると沈殿が生じやすいが、その沈殿も 1 M の重水素化 COS の添加で防止できた。</p> <p>1 M の重水素化 COS の存在下では <math>G\alpha_{i1}</math> の添加による m4I3C(14) のシグナル変化が観測できなかったが、これは <math>G\alpha_{i1}</math> と m4I3C(14) との結合が強すぎるためと判断された。そこで、重水素化 COS の濃度を 2 M に上げたところ、m4I3C(14) のシグナル変化が複数箇所観測され、それは <math>G\alpha_{i1}</math> との特異的な結合が予想される残基に由来していた。残念ながら相互作用に伴う NOE は観測されなかったが、相互作用を</p>

		<p>弱める工夫を施すことにより、NOE として観測できるようになると期待された。</p> <p>なお、m4I3C(14)の帰属も各種三次元測定で行った。</p>
	<p>今後の展開、課題</p>	<p>不安定なサンプルの測定は安定化剤の存在下でも楽ではないことを痛感した。今後、更に強力な安定化剤を開発し、不安定なサンプルでも多くの研究者が安心して測定できる状況を達成したい。</p> <p>なお、<math>G\alpha_{i1}</math>との相互作用が比較的弱いm4I3C(14)のアナログを調製中であり、それができた時点であらためて重水素化 COSY 存在下で <math>G\alpha_{i1}</math>との相互作用を解析したい。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>凝集防止剤の作用メカニズムを明らかにした上で有用性を周知すれば、製薬分野など多くの会社や研究機関での使用が促され、新製品の開発に寄与すると期待される。新薬開発の促進は人類の健康に寄与する。また、蛋白質の凝集防止・安定化は様々な産業での蛋白質の利用を促進し、経済全体を活性化すると期待される。</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>測定していただいた担当者は極めて優秀でした。これは理研で NMR を用いた研究を活発に行っており、研究レベルが非常に高いからだ と推察されます。また測定担当者・管理者ともに非常に親切で大変助かりました。</p> <p>データがサーバからダウンロードできるようになったので、非常に便利になりました。</p>
<p>利用周辺環境に関する希望</p>	<p>特にございませぬ。</p>
<p>今後の利用形態の予定</p>	<p><input type="checkbox"/> 再度本事業への申請を考えている。</p> <p><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。</p> <p><input type="checkbox"/> その他理研との共同研究等を考えている。</p> <p>具体的に：</p> <p><input type="radio"/> 未定</p>
<p>今後期待するその他のサービス</p>	<p><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)</p> <p><input type="checkbox"/> NMR 装置利用の技術的なサポート</p> <p><input type="checkbox"/> その他</p> <p>具体的に</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>(<a href="http://kyoyonavi.mext.go.jp/">http://kyoyonavi.mext.go.jp/</a>)  <input checked="" type="radio"/> 見た : <input type="radio"/> 見ていない  感想等：  情報が一カ所にまとまっているのが便利だと思います。</p>
<p>その他</p>	<p>（上記の項目以外でご意見等お願いします。）   大変お世話になりました。どうも有り難うございました。</p>

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。