

理研NMR施設利用報告書  
(トライアルユース)

13-500-039

平成 26 年 7 月 25 日

利用機関名	クロレラ工業株式会社	
実施部署名	生産本部 技術特販部	
実施責任者管理職名・氏名	岩坂昌樹	
実施部署所在地	福岡県筑後市久富 1343	
実施部署連絡先		
利用課題名	安定同位体標識法によるウイルス蛋白質の解析	
利用目的・内容	天然変性の傾向を持つと推測された HIV-1 の殻蛋白質であるマトリックス蛋白質とカプシド蛋白質の変異体を安定同位体標識して作成し、動的揺らぎ構造へのアミノ酸変異による影響を、高磁場 NMR を用いることによって解析していく。新しい野生株も樹立する。	
利用実施時期及び期間	平成 25 年 11 月 1 日～平成 26 年 4 月 30 日  当初計画どおり (変更理由)	
利用施設	NMR 装置 (該当部分に○)	利用装置① ・ ( <input checked="" type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="radio"/> ) 700MHz、( <input type="radio"/> ) 800MHz、( <input type="radio"/> ) 900MHz 利用期間 1 : 平成 26 年 2 月 26 日～平成 26 年 3 月 3 日 <hr/> 利用装置② ・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 700MHz、( <input type="radio"/> ) 800MHz、( <input type="radio"/> ) 900MHz 利用期間 1 : 平成 26 年 2 月 10 日～平成 26 年 2 月 17 日

	利用期間 2 : 平成 26 年 3 月 10 日～平成 26 年 3 月 17 日 利用期間 3 : 平成 26 年 3 月 31 日～平成 26 年 4 月 7 日 利用期間 4 : 平成 26 年 4 月 21 日～平成 26 年 4 月 28 日
	利用装置③ ・ ( )600MHz、( )700MHz、(○)800MHz、( )900MHz 利用期間 1 : 平成 26 年 2 月 17 日～平成 26 年 2 月 24 日 利用期間 2 : 平成 26 年 3 月 17 日～平成 26 年 3 月 31 日 利用期間 3 : 平成 26 年 4 月 8 日～平成 26 年 4 月 21 日
	利用装置④ ・ ( )600MHz、( )700MHz、( )800MHz、(○)900MHz 利用期間 1 : 平成 26 年 2 月 10 日 ～ 平成 26 年 2 月 17 日 利用期間 3 : 平成 26 年 3 月 3 日 ～ 平成 26 年 3 月 17 日 利用期間 4 : 平成 26 年 3 月 17 日 ～ 平成 26 年 3 月 24 日 利用期間 5 : 平成 26 年 3 月 27 日 ～ 平成 26 年 3 月 31 日 利用期間 6 : 平成 26 年 3 月 31 日 ～ 平成 26 年 4 月 7 日
	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 9 回 ・ 大量調製 : 利用回数 13 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

<p>成果の概要</p>	<p>実施内容</p>	<p>※実際に行った作業の概要について記載してください。</p> <p>ワクチンの作製に関わる HIV-1 マトリックス蛋白質とカプシド蛋白質の変異体の作成をおこなった。マトリックス蛋白質の変異体の作成はやや困難であり、E12A は発現したものの、L85A の発現量は低かった。H89A はほとんど発現しなかった。一方、カプシド蛋白質に関しては、M68T と P90T の発現はうまくいったが、G60W と I115T の発現量は少なく、測定を断念することとなった。実際に発現された変異体は、解析可能な NMR スペクトルを与えた。</p> <p>N タグや C タグの付残ったものを、カプシド蛋白質としてこれまで使用してきたが、今回の変異体を作り始める前に、N 端に GSSGSSG という最小のリンカー配列だけを残したものを新しくコントロールとして樹立し、NMR スペクトルを測定した。シグナル帰属も新しい野生株で新たに確立した。シグナル帰属に基づいて解析すると、新しい野生株は予想どおり、45 ループ領域において柔軟な構造を持っていたが、それ以外の領域では、N 端以外は折りたたまれた構造を保持していた。その N 端領域の柔軟性は、Pro1 と Asp51 間のソルトブリッジが、GSSGSSG が存在するだけで作られないことによると判断した。カプシド蛋白質は、N 端や C 端にやや長いタグを残すだけでも、不安定な構造をとることがわかってきた。</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>※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。</p> <p>NMR の測定としては、マトリックス蛋白質の E12A と L85A のシグナル帰属用の 3D と、揺らぎ構造を明らかにする緩和実験の測定を行うことができた。またカプシド蛋白質では、今回は新しい野生株を確立することができ、さらに M68T と P90T のシグナル帰属用の 3D と緩和実験を測定することができた。変異体のシグナルは、今回デザインされたすべての変異体において、有意なシグナルのシフト変化が野生株と比較して観測されているので、何らかの構造変化を伴っていると考えられた。</p> <p>当初の予定では、変異体のシグナル帰属が現時点で終わっている予定であったが、カプシド蛋白質の新しいコントロール実験のために新しい野生株を樹立したことなどにより、時間を要した。しかしながら、実験計画は順調に進行しているといえる。これから多くの解析に移るが、計算が多く時間を要す。マトリックス蛋白質変異体は、やや不安定であり調整が難しいが、一度調整完了すると NMR シグナルはきれいに分離して観測されるので、よい結果が得られると期待できた。E12A 変異体から、きれいなシグナルが得られた。</p>

<p>今後の展開、課題</p>	<p>※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。</p> <p>天然変性蛋白質を対象として用いて、今回は比較的構造を持つ marginally な安定性をもつ蛋白質の揺らぎ構造解析を行ってきた。一方今後は、構造がほとんど壊れており、残存構造として、かすかな構造のみをしめす天然変性蛋白質の NMR による構造解析を目指す。このように多角的な観点から、天然変性を解析していく。残存構造の検知に鋭敏な化学シフト変化を観測し、これまでわからなかった構造を、側鎖の観点から幅広く明らかにしていくことを目標とする。同時にこれまで中心だった主鎖のラベルから、側鎖の安定同位体ラベルへと発展できるようにしていく。さらに安定同位体標識において、これから新しい市場を開拓していく。</p> <p>天然変性蛋白質を marginally な安定性をもつ揺らぎ構造解析から、変性状態中に存在する残存構造の解析へと幅広く行うことにより、天然変性度の異なる段階別アプローチを行っていく。このアプローチによって、蛋白質の構造の進化との関わりも考えていく。今後は NMR の揺らぎ情報に基づいて、新たな変異体の作成も試みてみたい。どのデザインを行っても、不安定化し実際に変異体を得ることが難しいことが多かったので、その点を改良していきたい。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>本研究では、HIV-1 を覆う殻の蛋白質の研究により、治療効果の高いワクチン開発を目指すとともに、安定同位体標識 NMR の広い生化学者への普及を目指していく。天然変性蛋白質は、とてもよい研究のターゲットとなることに疑いの余地はない。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>( ) あり : (○) なし 「あり」の場合理由:</p>
<p>理研 NMR 施設利用における感想</p>	<p>※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。</p> <p>蛋白質の作成やマシンタイムに関して、さまざまなこちらの要望に応じてくださるので、大変に助かりました。NMR の基礎的な情報もわかりやすく教えてくださるので、理解が深まりました。これからの研究の発展に明るい見通しを与えてくれました。</p>

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	<input type="radio"/> 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="radio"/> 見た : <input type="checkbox"/> 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。)

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。