

## 理研NMR施設利用報告書

(産学連携無償利用)

13-700-002

平成 27 年 2 月 22 日

利用機関名	東京工業大学
実施部署名	大学院生命理工学研究科分子生命科学専攻
実施責任者管理職名・氏名	準教授 / 林 宣宏
実施部署所在地	神奈川県横浜市緑区長津田町 425
利用課題名	ストレス応答因子の機能構造解析による分裂酵母物質生産系の生産性の向上
利用目的・内容	<p>分裂酵母 <i>S. pombe</i> を用いた物質生産系の開発を進めている。</p> <p>課題申請者らは、<i>S. pombe</i> がストレスを感じると Hsp9 が高発現することを見出した。強制的な物質生産によるストレスを軽減していると考えられる Hsp9 の機能を制御出来れば、より高品質のプロダクトを、より高効率で生産可能である。そこで、Hsp9 の機能構造解析を開始した。</p> <p>最初に、分裂酵母用の安定同位体標識培地を検討し、<i>S. pombe</i> の安定同位体標識に成功した。</p> <p>次に、この培地を用いて分裂酵母を培養し、安定同位体標識した Hsp9 を調製した。これはリコンビナントではなく、天然のものなので、翻訳後修飾、等も本来の状態を保っている。</p> <p>最近、Hsp9 が細胞膜近傍で機能する分子シャペロンであることが示唆されたので、本研究課題では、膜近傍での機能構造解析により、Hsp9 がストレス応答時に、どのように機能しているのかを明らかにすることを目的にしている。そのために、以下の課題を遂行する。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 細胞膜近傍で機能する分子シャペロンであることが示唆されている Hsp9 の、膜近傍での機能構造を明らかにする。</li> <li>2. 現在、Hsp9 と相互作用する因子の同定を進めている。課題実施期間中に何らかの因子が同定された場合は、Hsp9 との複合体の機能構造解析を行う。</li> </ol>

利用実施時期及び期間	<p>平成 26 年 9 月 24 日 ~ 平成 26 年 9 月 29 日</p> <p>当初計画どおり <input checked="" type="radio"/> 当初計画変更 <input type="radio"/> (どちらかを○で囲む)</p> <p>(変更理由)</p> <p>当初は容易だと考えていた測定試料調製に、想定外に手間取ったため。</p>	
利用施設	<p>NMR 装置 (該当 部分に ○)</p>	<p>利用装置①</p> <p>・ <input type="checkbox"/> 溶液 600MHz、<input type="checkbox"/> 溶液 700MHz、<input checked="" type="checkbox"/> 溶液 800MHz、 <input type="checkbox"/> 溶液 900MHz、<input type="checkbox"/> 固体 700MHz</p> <p>利用期間 1 : 平成 26 年 9 月 24 日 ~ 平成 26 年 9 月 28 日</p>
利用満足度 (複数選択不可)	<p><input type="checkbox"/> 大いに満足、<input checked="" type="checkbox"/> ほぼ満足、<input type="checkbox"/> やや不満、 <input type="checkbox"/> 大いに不満</p>	
研究チームの構成 (連携機関先も含む)	<p>東京工業大学 大学院生命理工学研究科 分子生命科学専攻 准教授 林 宣宏</p> <p>旭硝子株式会社 主幹 東田 英毅</p>	

成果の概要	実施内容	<p>本課題実施前に分裂酵母の安定同位体標識法を開発していたが、分裂酵母はプロテアーゼ活性が高く、NMR の測定中に分解しない精製度のサンプルを大量に調製することが困難だったので、解析試料 (<i>S. pombe</i> の Hsp9) の大腸菌を用いた大量発現系を構築した。</p> <p>次に、これを用いて安定同位体標識した Hsp9 の調製を試みたが、安定同位体標識用の培地に換えると発現株の生育が極端に悪くなり、また、リコンビナントが発現しなくなるという問題が起きた。この問題を解決するために、発現ベクターの改変や、培養条件の検討、培地組成の至適化を行い、高発現条件を見いだした。</p> <p>この方法を用いて大腸菌で調製した安定同位体標識 Hsp9 の測定を試みたが、試料調製時に別の問題（濃縮時の器具への吸着）が起こり、充分量の試料での測定は出来なかった。しかしながら、塩濃度、等の条件を変えた測定を実施することが出来て、Hsp9 の分子物性に関するいくつかの知見（濃度、および、イオン強度依存的な凝集、等）を得ることが出来た。</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>今回は、新たに開発した大腸菌を用いる発現系で安定同位体標識した Hsp9 の調製と、その NMR スペクトルの測定には成功した。しかしながら、当初、想定していた以下の課題には至らなかった。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 人工再構成膜として想定しているミセルとの相互作用を SPR 法や CD スペクトルの解析により行う。</li> <li>2. 相互作用が確認されたミセル共存下での Hsp9 の機能構造を NMR で行う。</li> <li>3. プロテオミクス的手法により Hsp9 と相互作用する因子の同定を進める。なんらかの因子が同定された場合には、単独、および、Hsp9 と複合体形成した場合の機能構造を NMR で解析する。</li> </ol>

	今後の展開、課題	<p>今回、新たに構築した手法を用いた安定同位体標識試料調製に関して、想定外の問題が生じたが、本課題実施期間内に解決することが出来た。</p> <p>今後は、本法で NMR の測定に堪える安定同位体標識試料を調製して、当初、設定した課題を順次進める。</p>
社会・経済への波及効果の見通し	<p>分裂酵母は物質生産系として有望視されており、既にいくつかのものについては、商用レベルでの物質生産が始まっている。</p> <p>しかしながら、人為的に物質を強制生産させたときには生産性の低下が見られ、ストレス応答による生産制御が問題となる。本研究でストレス応答をコントロールできれば、より高収率の物質生産が可能となる。</p>	
成果公開延期の希望の有無	<p>( <input type="radio"/> ) なし : ( <input type="checkbox"/> ) あり</p> <p>「あり」の場合理由 :</p> <p>延期希望期間 : (利用報告書提出日より最大 2 年)</p>	
理研 NMR 施設利用における感想	<p>今回は、想定外的大幅な実施時期の延期があったにもかかわらず、担当部署に対応していただき、なんとか（最低限ではあるが）成果を出すことが出来たことを感謝したい。</p> <p>また、実験時には、得られたデータをふまえた次の測定プランの立案に、ディスカッションにより非常に積極的に尽力していただいた。NMR を用いた解析には、本来、その分野の専門家の力が必須であるが、トライアルユースでの使用者は専門家でないことが想定されるので、今回、我々が受けたような支援は、今後も、是非とも要望される。</p>	
利用周辺環境に関する希望	<p>測定の待ち時間に待機出来るような、デスクとゲスト用の無線 LAN 環境があるスペース（部屋）が望まれる。</p>	
今後の利用形態の予定	<p>( <input type="radio"/> ) 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>( )その他理研との共同研究等を考えている。  具体的に：</p> <p>( )未定</p>
今後期待するその他のサービス	<p>(○) 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</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>(<a href="http://kyoyonavi.mext.go.jp/">http://kyoyonavi.mext.go.jp/</a>)  (○) 見た : ( ) 見ていない  感想等：当該サイトには多数の施設が登録されているが、その使用には敷居が高い。より周知されて、ユーザーが増えて、抵抗感なく共用できることが望まれる。</p>
その他	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)  各事業所（大学、会社、等）でNMRを継続的に維持することは、昨今、非常に難しくなっており、また、非効率的である。さらに、NMRの扱いには高度のスキルと経験が必要とされ、装置だけがあっても、専門家がいなければ運用出来ない。従って、NMRに関しては、特に、本事業の継続が強く望まれる。</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。