

理研NMR施設利用報告書  
(産学連携無償利用)

13-700-007

平成 26 年 9 月 24 日

利用機関名	千葉工業大学	
実施部署名	工学部生命環境科学科	
実施責任者管理職名・氏名	教授 / 河合剛太	
実施部署所在地	千葉県習志野市津田沼 2-17-1	
利用課題名	無細胞タンパク質生合成系による安定同位体標識塩基性ペプチドの調製法の確立とRNAとの相互作用の解析	
利用目的・内容	無細胞タンパク質生合成系を用いることで安定同位体標識された塩基性ペプチドの調製および調製法を確立する。また、調製したペプチドとRNAとの相互作用を超高感度NMR分光計を用いて解析し、相互作用様式を解明する。	
利用実施時期及び期間	平成 26 年 1 月 9 日～平成 26 年 7 月 4 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 利用期間1:平成 26 年 3 月 20 日～平成 26 年 3 月 24 日
	立体構造解析 パイプ ライン	・発現確認 : 利用回数 6 回
		・フォールド判定 : 利用回数 4 回
		・大量調製 : 利用回数 4 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	

研究チームの構成		<p>千葉工業大学 代表者 工学部 生命環境科学科 構造生物学研究室 教授 河合剛太</p> <p>275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1</p> <p>大陽日酸株式会社 代表者 開発・エンジニアリング本部 つくば研究所 SI 開発部 SI 開発課 課長 横山 順</p>
成果の概要	実施内容	<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>理化学研究所によって調製された ZfL2-1, ZfL2-2 由来の 2 種類のペプチドと 3 種類の RNA (ZfL2-1-34, ZfL2-1-34-G10, ZfL2-2-17) を用いてゲルシフト法による相互作用実験を行った。LINE RNA とペプチドのモル比が 1:1 および 1:3 になるように試料を調製し、12% 非変性 PAGE を行った。ZfL2-1 由来のペプチドは 3 種類の RNA のいずれとも結合したが、ZfL2-2 由来のペプチドは ZfL2-1-34-G10, ZfL2-2-17 のみ結合し、ZfL2-1-34 とは結合しなかったことから、認識の特異性が示唆された。なお、この解析は SUMO タグが連結された状態での試料において行った。</p> <p>超高感度 NMR 分光計を用いた RNA の解析では、ペプチドとの相互作用に利用する予定の 2 種類の RNA (ZfL2-1-34, ZfL2-1-34-G10) について、RNA 単体の NMR スペクトルを得ることができた。現在までに、ZfL2-1-34 の立体構造を決定し、また、ZfL2-1-34-G10 については暫定的な立体構造が得られている。</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>無細胞タンパク質合成系を用いて、His タグおよび SUMO タグを付加したペプチドを合成し、精製・タグ切断を行う方法によって、目的の塩基性ペプチドを得ることができたことは、今後の RNA 結合ペプチドの調製に応用できる可能性が高く、大きな成果である。ZfL2-1 および ZfL2-2 のペプチドを合成することができた。しかし、ペプチドの安定化や高純度・高濃度試料の取得など、課題が残っている。また、相互作用解析を進めるために重要な標識試料が合成できていない。</p> <p>調製したペプチドは、電気泳動法による相互作用解析（ゲルシフト法）において認識特異性が示唆された。したがって、このペプチドを用いて、逆転写酵素の基質識別機構の解析を進められることがわかった。</p> <p>一方、RNA 単体の立体構造もほぼ決定しており、NMR 法による相互作用解析の実現可能性は明確になったと考えている。</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>ペプチドが安定して存在できる溶媒や濃縮方法など、さらなる条件検討が必要である。また、NMR 法を用いて RNA とペプチドとの相互作用解析を行うため、標識したペプチドの高純度試料の調製が必要である。すでに特異的な相互作用が確認されているので、標識ペプチドが得られれば超高感度 NMR 分光計を用いて相互作用様式を解明できると考えている。</p>

<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>RNA とタンパク質との相互作用は、RNA のプロセッシングや安定性の制御などにおいて重要である。したがって、本課題によって塩基性ペプチドの調製手法を確立することは、今後、さまざまな生命現象のメカニズムを明らかにするために有用である。</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>装置の故障で予約していた日時で測定することが出来なくなってしまい、他の日に振り替えて測定したが使用時間が短くなった。NMR 施設をさらに充実させていただくことを希望します。</p> <p>立体構造解析パイプラインで行った発現確認やフォールド判定の結果などについて、例えば Web で随時確認できるようなシステムがあると良いと思います。</p>
<p>利用周辺環境に関する希望</p>	<p>特にありません。</p>
<p>今後の利用形態の予定</p>	<p>( ○ ) 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：</p>

	( )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 (特にありません.)
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> ) ( ) 見た : ( O ) 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。)  今後ご支援をよろしくお願いします。

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。