

理研NMR施設利用報告書
(トライアルユース)

14-500-044

平成 27 年 4 月 27 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関連変性蛋白質の解析	
利用目的・内容	種々の安定同位体標識を行い、これまで性格づけが困難であった天然変性蛋白質の異なる残存構造解析と、主鎖から側鎖までのシグナル帰属解析を行うことを目的とする。	
利用実施時期及び期間	平成 26 年 9 月 9 日 ~ 平成 27 年 3 月 2 日 当初計画どおり (変更理由)	
利用施設	立体構造解析パイプライン	<ul style="list-style-type: none"> ・ 発現確認 : 利用回数 2 回 ・ フォールド判定 : 利用回数 0 回 ・ 大量調製 : 利用回数 7 回
	NMR装置	利用装置① ・ (○) 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、

	<p>(該当部分に○)</p>	<p>()溶液 900MHz、()固体 700MHz 利用期間 1：平成 26 年 9 月 29 日～平成 26 年 10 月 13 日</p> <hr/> <p>利用装置② ・ ()溶液 600MHz、(○)溶液 700MHz、()溶液 800MHz、 ()溶液 900MHz、()固体 700MHz 利用期間 1：平成 26 年 12 月 15 日～平成 26 年 12 月 21 日 利用期間 2：平成 27 年 1 月 5 日～平成 27 年 1 月 12 日 利用期間 3：平成 27 年 2 月 2 日～平成 27 年 2 月 15 日 利用期間 4：平成 27 年 2 月 23 日～平成 27 年 3 月 1 日</p> <hr/> <p>利用装置③ ・ ()溶液 600MHz、()溶液 700MHz、()溶液 800MHz、 (○)溶液 900MHz、()固体 700MHz 利用期間 1：平成 26 年 11 月 18 日～平成 26 年 11 月 18 日</p>
	<p>構造決定</p>	<p>利用回数 0 回</p>
<p>利用満足度 (複数選択不可)</p>	<p>(○)大いに満足、()ほぼ満足、()やや不満、 ()大いに不満</p>	

<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>本研究では、天然変性蛋白質の NMR 構造解析のための種々の安定同位体標識をおこない、それぞれの標識の有効性を調べた。無細胞系蛋白質発現システムにおいて、^{15}N シングルラベル体と $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ ダブルラベル体の作成をまずおこない、さらに ^{13}C シングルラベル体を作成した。天然変性蛋白質であるペリフェリン 2 と、はしかウイルス N_{tail} ドメインを蛋白質として用いた。頻繁には行われないう ^{13}C シングルラベル標識であっても、アミノ酸の添加量の工夫により、それぞれの蛋白質を、ダブルラベル標識蛋白質と同程度の発現量で得ることができた。^{15}N シングルラベル標識体では HSQC スペクトルなどを測定し、$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ ダブルラベル標識体では、主鎖のシグナル帰属のための HNCQ、HNCACO、HNCA、HN(CO)CA、HNCACB、CBCA(CO)NH などを測定した。^{13}C シングルラベル体においては、^{13}C-HSQC、HCCH-TOCSY と HCCH-COSY 系の測定を行った。さらに一部の測定は異なる温度と異なる pH においても行われた。2 種の異なる蛋白質を用いた理由は、分子量が異なり、さらに天然変性度が異なる二つの蛋白質において、どのように異なる化学シフトとピーク強度の測定結果が得られるかを比較することにあつた。</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>天然変性蛋白質特有のシグナルの重なり合いが激しいケースであっても、アミノ酸残基数 63 と 125 の主鎖の連鎖シグナル帰属には成功した。現在、HCCH-COSY、HCCH-TOCSY を用いて、主鎖の帰属情報を側鎖に繋げている。また主鎖のシグナル帰属に基づいて、Δ2d 法による化学シフト値からの 2 次構造解析をおこなった。天然変性部位の中には、主鎖において、有意に微小なヘリックス構造とベータ構造が含まれていることがわかった。この結果は側鎖間においても、疎水性相互作用が一部できている可能性を示唆している。実際、同一アミノ酸種由来と思われる一部の側鎖シグナルが、他のシグナルと分離して観測されている。さらに側鎖の帰属と化学シフト値を得るときに有用な ^{13}C ラベル体と $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ ダブルラベル体の解析を組み合わせる方法を用いているが、まだ有用な結論を得るところまでには到達していない。したがって全般的にみて、同位体標識蛋白質の作製と、NMR スペクトルの測定までは完了しているが、今後のスペクトル解析に期待がもたれる段階である。</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>これまでは ^{13}C シングルラベル体と、$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ ダブルラベル体のスペクトルを主に測定してきたが、さらに今後は、重水素化ラベルしたトリプルラベル体の測定結果を加える有用性を、天然変性蛋白質の解析に関して示していきたいと考えている。また、当初予定していた変性剤などを加えていくときに観測される化学シフト変化とピーク強度変化の測定実験も今後は行いたい。それらの実験に基づいて、従来の解析方法とは異なる方法を確認することと、質の異なる変性状態中での残存構造の情報を得ることを、ラベル化の工夫から達成できるように努力していきたいと考える。特に ^{13}C シングルラベル体解析を加えることの有用性を、^{13}C-HSQC と HCCH-TOCSY において示していきたい。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>最近、機能的に注目される天然変性蛋白質の新しい構造解析法を樹立することが、構造生物学上において重要な意義があると思われる。さらに、種々のラベル体の作製法に伴って、安定同位体標識法の発展に起因する経済波及効果があると思われる。</p>	
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>(<input type="radio"/>) なし : (<input type="checkbox"/>) あり 「あり」の場合理由： 延期希望期間 : (利用報告書提出日より最大2年)</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>とても効率的に実験を行わせて頂きましたので感謝しております。</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： ()未定</p>
<p>今後期待するその他のサービス</p>	<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>
<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>(http://kyoyonavi.mext.go.jp/) (○) 見た : () 見ていない 感想等：</p>

その他	(上記の項目以外でご意見等お願いします。) 特にありません。
-----	-----------------------------------

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。