

## 理研NMR施設利用報告書

(産学連携無償利用)

14-700-010

平成 27 年 6 月 3 日

利用機関名	東北大学	
実施部署名	医学系研究科	
実施責任者管理職名・氏名	助教 / 鈴木隆史	
利用課題名	NMR を用いたストレスセンサーKeap1 の構造解析	
利用目的・内容	<p>ストレスセンサーKeap1 は転写因子 Nrf2 のユビキチン化反応を制御し酸化ストレス防御機構の中心的役割を担う鍵因子である。Nrf2 は酸化ストレス・異物代謝に関わる遺伝子群を統一的に制御し生体防御に働くため、様々な疾患の予防・治療への応用を目指して多くの Nrf2 誘導剤の開発が進んでいる。Nrf2 活性化に重要な Keap1 分子のセンサーシステイン残基は同定されているものの、その構造解析は蛋白質結晶化が困難なため滞っている。Keap1 分子の構造が明らかになれば、創薬研究に非常に有益な情報を与える。そこで、本申請課題では、NMR を用いた構造解析により Keap1 の構造解析を行い、ストレス感知の分子機構を明らかにすることを目的とする。</p>	
利用実施時期及び期間	平成 26 年 10 月 21 日 ~ 平成 27 年 5 月 15 日	
	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">当初計画どおり</div> ・当初計画変更（どちらかを○で囲む） (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"> <li>・発現確認 : 利用回数 1 回</li> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <li>・フォールド判定 : 利用回数 0 回</li> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <li>・大量調製 : 利用回数 3 回</li> </ul>
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 (連携機関先も含む)	東北大学大学院 医学系研究科 医化学分野 山本雅之 (代表) 東北大学大学院 医学系研究科 医化学分野 鈴木隆史 (担当者)  持田製薬株式会社 創薬研究所 古迫正司 (代表)	

		持田製薬株式会社 創薬研究所 生物研究室 生物3 白水郁也 (担当者)
成果の概要	実施内容	Keap1 蛋白質の立体構造を明らかにするために、大腸菌由来の無細胞蛋白質合成系を用いて、各種の部分領域タンパク質の発現系を構築し、可溶性を確認した。次に可溶性の良いタンパク質を選んで安定同位体標識を行い、精製後、 $2D\ ^1H,^{15}N$ -TROSY スペクトルを測定した。得られたスペクトルを解析し、構造解析に適した発現系を探索した。得られた発現系や構造情報を元に今後持田製薬を中心に創薬研究を進める予定である。
	本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較	Keap1 蛋白質の内、システイン残基が多く存在する N 末端領域に関して、比較的可溶性の良い発現系を複数構築した。これらのタンパク質の安定同位体標識体を作成し、 $2D\ ^1H,^{15}N$ -TROSY スペクトルを測定した結果、高次構造を形成していることを確認した。最も性質の良いコンストラクトに関しては、 $2H,^{13}C,^{15}N$ トリプル標識体を作成し、帰属に必要なスペクトル (TROSY-HNCA 等) を測定した。現在得られたスペクトルの解析を行っている。当初の予定では Keap1 の構造解析により分子認識機構を明らかにする予定であったが、発現系の構築に手間取ったため目標の途中段階で利用期間が終了してしまった。今後さらなる解析が必要である。
	今後の展開、課題	Keap1 蛋白質の発現系をさらに改良し、より可溶性の良く且つ安定なタンパク質が得られる条件を探索する。また得られたスペクトルを解析し、Keap1 の構造解析を進める。なお、得られた発現系や構造情報を元に今後持田製薬を中心に創薬研究を進める予定である。
社会・経済への波及効果の見通し		構造決定まで至らなかったため、社会・経済への波及効果は、現時点ではあまりないと考えられる。
成果公開延期の希望の有無		( <input type="radio"/> ) なし : ( <input type="radio"/> ) 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)

理研 NMR 施設利用における感想	Keap1 蛋白質の各種発現系を検討できたこと、また解析に必要な 2H,13C,15N トリプル標識体が合成できたことは、Keap1 の構造解析を進める上で、非常に役に立ったと考えております。
利用周辺環境に関する希望	特にありません。
今後の利用形態の予定	<input checked="" type="checkbox"/> 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 特にありません。
文部科学省の共用ナビゲーションサイト(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 checked="" type="checkbox"/> 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。