

理研NMR施設利用報告書  
(産学連携無償利用)

14-700-012

平成 27 年 5 月 14 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	無細胞タンパク質合成系による安定同位体標識塩基性ペプチドの調製法	
利用目的・内容	RNA と相互作用する塩基性ペプチドについては、化学合成での収率が低いことが知られている。したがって、安定同位体標識試料を化学合成法によって調製することは現実的でない。そこで、理化学研究所の無細胞タンパク質合成技術によって安定同位体標識された塩基性ペプチドを調製すること、および得られたペプチドを利用して、RNA との相互作用解析を実施し、その有用性を示すことを目的とした。	
利用実施時期及び期間	平成 26 年 9 月 18 日 ~ 平成 26 年 10 月 15 日  当初計画どおり・当初計画変更 (どちらかを○で囲む) (変更理由) 安定同位体標識ペプチドの合成を行うことはできたが、超高感度 NMR 分光計による相互作用解析は行わなかった。	
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 0 回</li> <hr/> <li>・フォールド判定 : 利用回数 0 回</li> <hr/> <li>・大量調製 : 利用回数 4 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	

<p>研究チームの構成 (連携機関先も含む)</p>	<p>本課題は、千葉工業大学の河合のグループと大陽日酸株式会社のグループが共同で実施した。</p> <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 275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1 メンバー 学生 1 名 (大津舞菜)</p> <p>大陽日酸株式会社 代表者 メディカル事業本部 SI 事業部 SI イノベーションセンター開発課 課長 横山 順</p>
<p>成果の概要</p>	<p>実施内容</p> <p>今回の課題は、平成 25 年度第 3 回の外部利用課題として採択された課題を継続したものある。前回までに、His タグおよび SUMO タグを付加したペプチドをある程度の精製度で調製することに成功しているが、今回はこの技術を利用して、安定同位体標識ペプチドを調製し、得られたペプチドを用いた相互作用解析を実施した。このペプチドの調製方法の検討について、連携先である大陽日酸株式会社と協力して進めている。</p> <p>ZfL2-1 および ZfL2-2 の 2 種類のペプチドの調製を計画したが、おそらく物性の違いによって、ZfL2-2 ペプチドのみ、安定同位体標識ペプチドが得られた。このペプチドを用い、<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H SQC スペクトルの測定を行ったところ、遊離状態ではランダムコイルと推定された。このペプチドに対して、それと相互作用する 34 残基の RNA を加えたところ、いくつかのクロスピークが消失した。一方、相互作用が弱いと推定されている RNA を加えた場合にもピークの消失が観測された。これに対して、RNA のイミノプロトンシグナルについては、相互作用する RNA ではペプチドを加えることによって新しいシグナルが複数観測されたが、もう一方の RNA では全体として広幅化するのみであった。</p> <p>以上の結果を第 53 回 NMR 討論会において発表した。</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>前回の申請において、次の2つの達成目標を掲げた。</p> <p>ひとつめの目標は、無細胞タンパク質合成系を利用して、標識塩基性ペプチドを高効率で調製する手法を開発することである。今回、ZfL2-2 ペプチドについては標識試料を調製することができ、NMR スペクトルの測定も実施できた。したがって、この目標については成果が得られた。His タグおよび SUMO タグを付加した状態で発現させ、その後タグを切り離す手法が機能したといえる。この発現系については、MTA 締結のもと、千葉工大に受け入れた。</p> <p>もうひとつの目標は、調製したペプチドを用いて行う解析である。これについても、標識された ZfL2-2 ペプチドを用いた NMR スペクトルの測定を千葉工大において行い、一定の結果を得て学会発表を行うことができた。しかしながら、現時点では複合体のスペクトルを測定するための条件検討が十分でなく、900 MHz 級の高分解能分光計による測定には至らなかった。</p>
<p>今後の展開、課題</p>	<p>前回の課題での問題点は、タグ切断後のペプチドが凝集および沈殿をおこすことであった。これについては、緩衝液をリン酸緩衝液に置換することによって、ある程度の改善を行うことができた。</p> <p>今後は、連携先である大陽日酸株式会社と協力して、千葉工大において標識ペプチドの調製方法を確立し、相互作用解析のために十分な量の試料を調製し、これを用いた研究を推進する予定である。また、この技術は大陽日酸株式会社にフィードバックし、塩基性ペプチド合成用のキットの開発等につなげたい。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>これまでに、大陽日酸株式会社との共同開発によって標識 RNA の調製技術を確立している。今回の成果によって、RNA と相互作用する塩基性ペプチドの標識技術が確立できれば、近年大きく注目されている RNA に関わる様々な生命現象の解明に役立てることができ、創薬を含めた産業の発展に波及すると期待できる。</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</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>取扱いが難しい塩基性ペプチドについて、精力的な実験によってある程度の量を調製して下さったことに大変感謝しております。</p> <p>今後は、この成果を様々な系に応用していきたいと考えております。</p>
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	<p><input type="checkbox"/> 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><input checked="" type="checkbox"/> その他理研との共同研究等を考えている。</p> <p>具体的に： 符号化標識法の塩基性ペプチドへの応用</p> <p><input type="checkbox"/> 未定</p>
今後期待するその他のサービス	<p><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)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> NMR 装置利用の技術的なサポート</p> <p><input type="checkbox"/> その他</p> <p>具体的に 非線形測定法などの導入</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>)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 見た : <input type="checkbox"/> 見ていない</p> <p>感想等： 可能なものがあれば、利用したい。</p>
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。