

理研NMR施設利用報告書  
(産学連携無償利用)

14-700-013

平成 27 年 10 月 19 日

利用機関名	高知大学	
実施部署名	高知大学教育研究部総合科学系黒潮圏科学部門	
実施責任者管理職名・氏名	教授 / 富永 明	
利用課題名	遅延型アレルギー反応試験による硫酸多糖体の効果の検証	
利用目的・内容	ハバノリ由来硫酸多糖体およびヘパリンが自然免疫受容体 toll-like receptor 4 (TLR4) 依存的に遅延型アレルギーを抑制する機構を解明するため、TLR4 複合体、特に MD-2 と TLR4 に硫酸多糖体が結合するかどうかを溶液状態の NMR で検討することを計画した。	
利用実施時期及び期間	平成 27 年 2 月 2 日～平成 27 年 7 月 2 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)	
利用施設	NMR 装置 (該当部分に○)	<p>利用装置①</p> <p>・ ( ) 600MHz、( ) 700MHz、( ○ ) 800MHz、( ) 900MHz</p> <p>利用期間 1 : 平成 27 年 4 月 13 日 ~ 平成 27 年 4 月 19 日</p> <p>利用期間 2 : 平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日</p>
		<p>利用装置②</p> <p>・ ( ) 600MHz、( ) 700MHz、( ) 800MHz、( ○ ) 900MHz</p> <p>利用期間 1 : 平成 27 年 4 月 20 日 ~ 平成 27 年 4 月 26 日</p> <p>利用期間 2 : 平成 27 年 5 月 7 日 ~ 平成 27 年 5 月 13 日</p> <p>利用期間 3 : 平成 27 年 6 月 1 日 ~ 平成 27 年 6 月 7 日</p>

	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 3回</li> <li>・フォールド判定 : 利用回数 0回</li> <li>・大量調製 : 利用回数 1回</li> <li>・構造決定 : 利用回数 0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		<p>高知大学総合科学系黒潮圏科学部門・医学部分子細胞生物学部門 教授・富永明 高知大学総合科学系複合領域部門・総合研究センター海洋部門 特任講師 山田和彦： 硫酸多糖体と TLR4 複合体の相互作用の NMR による解析 住所 〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮高知大学医学部 分子細胞生物学, Innovative Marine Biotechnology</p> <p>株式会社ガルファーマ 社長 仁木敏朗： 抗アレルギー効果を利用した硫酸多糖体の商品化の検討 住所 〒761-0301 香川県高松市林町 2561-21</p> <p>東京大学医科学研究所 感染遺伝学分野教授 三宅健介 TLR4, MD2, CD14 遺伝子の供給と複合体形成への助言 〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1</p>
成果の 概要	実施内容	<p>マウスでの動物実験の結果でハバノリ硫酸多糖体が TLR4 依存的に遅延型アレルギー反応を抑制するため、利用した遺伝子はすべてマウスの系で準備している。</p> <p>東京大学医科学研究所・感染遺伝学分野・三宅健介教授から供与された TLR4, MD2 遺伝子を理化学研究所の大腸菌無細胞蛋白質合成系で調整していただいた。高知大学医学部分子細胞生物学の富永は、合成された蛋白質を可溶化し、高知大学 Innovative Marine Biotechnology の山田は藻類由来多糖体自体の構造を担当した。</p> <p>今回は株式会社ガルファーマでは抗アレルギー効果を利用した硫酸多糖体の商品化の検討は行えなかったが、脂質と結合すると報告されている MD-2 が直接硫酸多糖体と結合することがわかったことで、藻類多糖体の商品化に向けて弾みがついた。</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>理化学研究所の大腸菌無細胞蛋白質合成系で合成を行っていただいた結果、MD-2 は十分量合成できたが沈殿物となった。ところが、TLR4 は利用可能な量は合成できなかった。</p> <p>高知大学医学部分子細胞生物学の富永は、MD-2・His-tag を 8 M 尿素で可溶化し、His-tag の Ni<sup>2+</sup> への結合性を利用して Biacore センサーチップに結合をさせることに成功した。この状態で MD-2 がハバノリ多糖体、ヘパリンと結合することを確認した。また、この Biacore での多糖体と MD-2 相互作用試験が NMR の予備試験として使用できることを確認した。</p> <p>高知大学 Innovative Marine Biotechnology の山田は藻類由来多糖体自体の構造を解明すべく NMR により多変量解析を行った。糖鎖に結合している様々な修飾基を検出したが、抗アレルギー活性と多糖体の特徴を関連づけるにはさらなる解析が必要である。</p> <p>今回は株式会社ガルファーマでは抗アレルギー効果を利用した硫酸多糖体の商品化の検討は行えなかった。しかし、リポ多糖(LPS)等の脂質分子 lipid A と結合すると報告されている MD-2 が直接ハバノリ硫酸多糖体と結合することがわかったことで、藻類多糖体の商品化に向けての展望が開けた。</p>
<p>今後の展開、課題</p>	<p>今度、この産学連携無償利用の研究を引き継ぐ研究として、硫酸多糖体と TLR4/MD-2 複合体の結合メカニズムの解明を目的とした特定課題利用「藻類多糖体による TLR4 依存的アレルギー反応抑制機構の解明」が採択された。この課題において硫酸多糖体と TLR4/MD-2 複合体の結合メカニズムの解明を進める計画である。TLR4/MD-2 複合体と相互作用する多糖体分子の関係が NMR を利用して簡便に検証できるようになれば、動物実験等の前に TLR/MD-2 複合体に影響を与える分子をより広範囲に短期間で試験できるようになると考えられる。これは免疫制御作用を調節する医薬品の開発に重要な役割を果たすと考えられる。</p> <p>課題は TLR4 が難溶性である点であり、より簡便に相互作用を解明できるような方法を開発する必要がある。</p>

社会・経済への波及効果の見通し	NMR の利用システムが構造解析の研究者向けに開発されているので、広く興味深い生命現象を解明できるよう、より広範な協力体制が必要ではないかと感じました。
成果公開延期の希望の有無	( ) あり : (○) なし 「あり」の場合理由:
理研 NMR 施設利用における感想	林文晶特別ユニットリーダーには、NMR 測定の際に大変お世話になりました。多糖体を含む生体分子系 NMR に関する豊富な知識を礎にした的確なアドバイスのお陰で、効率的に測定ができました。この場を借りてお礼申し上げます。
利用周辺環境に関する希望	
今後の利用形態の予定	( ) 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: 特定課題利用  ( ) 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: 硫酸多糖体の抗アレルギー活性を研究している富永が NMR 研究者の山田と共同で施設を利用させていただいたことに大変感謝しています。分子構造の研究を行っていない医学・生物学関連の研究者は NMR でできることとできないことの区別ができていないことを実感しました。 具体的な研究テーマで NMR がどのような特徴のある技術で何を解明することが有利なのか示していただけると、異分野間の共同研究を推進する上で大変有益だと思います。
文部科学省の共用ナビ	( <a href="http://kyoyonavi.mext.go.jp/">http://kyoyonavi.mext.go.jp/</a> ) (○) 見た : ( ) 見ていない

(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	感想等： NMR の知識のない研究者にもわかりやすい表示や、教育等の活動の紹介が必要ではないかと感じた。
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。