


超高磁場超高感度 NMR 装置利用による化合物のスクリーニング
利用成果報告書

公立大学法人横浜市立大学

機関名称	大陽日酸株式会社
部署名	SI 合成研究室
代表者・印	課長 阿部 俊文 
所在地	茨城県つくば市大久保 10
連絡先	TEL : 029-877-2126 FAX : 029-865-2714 E-mail : Toshifumi.Abe@tn-sanso.co.jp
利用区分	<input type="checkbox"/> 成果非専有利用 <input type="checkbox"/> トライアルユース
研究題目 (利用課題名)	高磁場・高感度 NMR による安定同位体標識 DNA ユニット品質保証方法の評価
研究目的及び内容 (課題の内容)	<p>弊社では ^{13}C, ^{15}N 標識 DNA ユニット (NTP, ヌクレオシド, アミダイト) の開発・製造を行っている。品質保証項目として HPLC による化学的純度の分析を行い、安定同位体標識率は投入原料の値を用いている。</p> <p>高磁場 NMR では化学構造だけでなく、DNA ユニットの部位特異的安定同位体標識率、微量不純物等の解析ができることが期待される。今回、横浜市立大学の NMR 専門家による測定から帰属・解析の指導の下、高磁場 NMR による DNA ユニットの品質保証への適用を目指す。</p>
利用した NMR	<input type="checkbox"/> 900MHz <input type="checkbox"/> 高感度フロー型クライオプローブ付 700MHz
研究 (利用) 期間	<p>研究 (利用) 時期 : 平成 19 年 11 月 1 日～平成 22 年 3 月 31 日</p> <p>研究 (利用) 期間 : 約 11 週 (総利用日数 79 日)</p> <p>※ 当初計画から変更があった場合は、その理由を記入してください。</p>

研究(利用)成果・実績の概要

弊社で開発・製造した ^{13}C , ^{15}N 標識 DNA ユニット 2 種類を横浜市立大学の高磁場高感度 NMR 装置で測定を行った。その結果、非標識 DNA では観測できない ^1H - ^{13}C や ^1H - ^{15}N の相関スペクトルが観測でき、両 DNA は確実に ^{13}C , ^{15}N 標識されていることが確認できた。

このうち 1 種類の DNA は予想される NMR スペクトルの数よりも多くのスペクトルが観測され、DNA が均一構造であるかが疑われた。そのため MS 測定を行った結果、目的 DNA と共に目的 DNA に 1 塩基もしくは 2 塩基付加と考えられる DNA が混入していることが確認された。この不純物の量が多いため、NMR スペクトルから目的 DNA の化学構造解析は不可能であった。

もう 1 種類の DNA に関しても予想される NMR スペクトルの数よりも多くのスペクトルが観測され、DNA が均一構造であるかが疑われた。この DNA はパリンドローム配列であり、1 本鎖からなるヘアピンループ構造を形成することが予想されたため、アニーリングにより DNA が 2 本鎖を形成しているかを確認するためにゲル電気泳動を行った。その結果、アニーリング前と後のバンドの位置に変化が見られず、DNA は 1 本鎖のままであることが確認された。しかし、NMR 測定により DNA 鎖間の水素結合（イミノプロトン）が観測されたことから、通常の 1 本鎖ではなくヘアピンループ構造を形成している 1 本鎖であることが確認された。

以上のように、安定同位体 DNA ユニットの NMR 測定することによって、化学構造の決定には至らなかったが不純物の混入が確認でき、今後の DNA ユニット製造に向けた配列検討に役立った。

また、弊社には NMR 利用経験のある人材がいなかったが、横浜市立大学の NMR 専門家によって測定や帰属の指導を受け、DNA ユニットの品質確認を行うことができた。

<p>社会・経済への波及効果の見通し</p> <p>※ 利用成果に基づくイノベーション創出性などについて記入してください。また、「トライアルユース」については、利用成果に係る分野の発展性や新分野開拓の可能性などを記入してください。</p>	<p>タンパク質-DNA 間相互作用や DNA をターゲットにする化合物との相互作用は生体内において非常に重要であり、NMR による DNA の化学構造解析はこのような相互作用解析に有用である。安定同位体標識 DNA を用いることによって、非標識 DNA を用いたときよりも短時間かつ容易に NMR による構造解析を行うことができる。</p> <p>今回の NMR 装置利用では、弊社が製造した DNA の安定同位体標識を確認し、さらにゲル電気泳動や MS 測定ではわからない目的 DNA 以外の不純物や化学構造を特定することができた。これにより、新規 DNA ユニット製造に向けた配列検討・改良に役立った。</p> <p>さらに DNA ユニットの部位特異的安定同位体に関しても、目的部分のみ標識されているか確認できることが期待される。DNA の部位特異的安定同位体は DNA-タンパク質相互作用などにおける DNA の相互作用部位の構造変化を NMR で確認する場合、全体を安定同位体標識しているものと比較してスペクトルの変化を確認するのが容易であり、創薬に重要な分子間相互作用の研究をよりスムーズかつ迅速に発展させる可能性がある。</p>
<p>公開延期の希望の有無</p> <p>※ 特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は、必ず事前に御相談ください。</p>	<p>() 有 (○) 無</p> <p>※ 「有」の場合、その理由を記入してください。</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>※ ユーザーサポート等で必要と考えられることがあれば記入してください。</p>

施設利用に係る感想・改善等	NMR 利用経験のある人材がいなくても、NMR に熟知した技術指導研究員による測定・帰属・解析の指導により研究を進めることができた。
「文部科学省の共用ナビ」に対する感想・改善等	
今後の利用希望等	
その他（上記項目以外での御意見等）	

※ 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。

※ 別途開催予定の利用成果報告会やシンポジウム等で、本報告書の内容についての資料作成や発表をお願いする場合があります。