

平成 23 年 11 月 29 日

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	メディカル事業本部 SI 事業部
代表者・印	折笠 敬 印
所在地	〒142-8558 東京都品川区小山 1-3-26 東洋 Bldg.
連絡先	TEL : 03-5788-8555 FAX : 03-5788-8710 E-mail : Sachiko.Abe@tn-sanso.co.jp
利用区分	() 成果非専有利用 (<input type="radio"/>) トライアルユース
研究題目(利用課題名)	DNA と DNA 結合タンパク質の機能・構造解析を目的とした、高磁場・高感度 NMR と安定同位体高度標識法のアプリケーション技術の開発
研究目的及び内容(課題の内容)	弊社の有する安定同位体標識のための「DNA 合成技術」・「タンパク質発現技術」を利用し、DNA と DNA 結合タンパク質を高度に安定同位体標識することで、これまで困難であった機能・構造解析を実施する。高磁場・高感度 NMR を活用し、横浜市立大学の NMR 専門家による測定からの帰属・解析の指導の下、難度の高い解析技術を確立し、同位体標識技術のアプリケーションの拡大を目指す。
利用した NMR	(<input checked="" type="radio"/>) 900MHz (<input type="radio"/>) 高感度フロー型クライオプローブ付 700MHz
研究(利用)期間	研究(利用)時期：平成 21 年 11 月 1 日～平成 23 年 3 月 31 日 研究(利用)期間： 3 週 (総利用日数 20 日) ※ 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。 当初は 900MHz NMR を利用予定だったが、施設側の都合により 700MHz NMR を利用した。また、マシンタイムの混雑と試料調製の遅れのため、当初予定していた利用期間 6 週よりも短い利用期間となった。

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 1 種類と ^{13}C , ^{15}N 部分標識 DNA ユニット 6 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。

^{13}C , ^{15}N 標識 DNA ユニット 1 種類は、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た。この DNA は別の長さで以前合成しており、その配列では予想される NMR スペクトルの数よりも多くのスペクトルが観測され、さらにゲル電気泳動で確認したところ、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。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、目的 DNA は形成されておらず、構造解析には至らなかった。しかし、今回配列と長さを改善した DNA では、予想通りの NMR スペクトルの数が観測でき、単独構造のみが存在すると考えられ、得られたデータから現在構造解析を進めている。さらに、この DNA は特定のタンパク質に結合する配列であり、DNA/タンパク質複合体の構造解析にも用いる予定である。

^{13}C , ^{15}N 部分標識 DNA ユニットは、同じ DNA 配列で異なる 6 塩基を選択して部分標識を行い、6 種類の DNA を合成した。この DNA は特殊な DNA 構造を形成するが、NMR スペクトルが重なっており通常の ^{13}C , ^{15}N 標識 DNA ではスペクトルの帰属と構造解析が難しい状況であった。しかし、部分標識 DNA を用いることによって今まで帰属することができなかったスペクトルも帰属することができた。この DNA 構造はタンパク質と相互作用することがわかっており、今後はタンパク質との複合体の解析にも有用であると考えられる。

弊社の有する安定同位体標識のための「DNA 合成技術」・「タンパク質発現技術」を利用して DNA を高度に安定同位体標識することで、高磁場・高感度 NMR を活用し、これまで困難であった機能・構造解析を実施することができた。

また、本課題は横浜市立大学の NMR 専門家によって測定や帰属の指導を受け、進めることができた。

<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>DNA とタンパク質の相互作用は生体内の機能を正常に機能させるために重要であり、この相互作用を解明するために NMR を用いた化学構造解析は有用であるが、中には構造解析が難しい DNA 構造やタンパク質も多くある。</p> <p>今回、弊社の有する安定同位体標識のための「DNA 合成技術」・「タンパク質発現技術」によって高度に安定同位体標識した DNA を、横浜市大の NMR 装置を用いて測定したことにより、弊社が製造した DNA の安定同位体標識を確認し、目的 DNA が単独構造を形成していることを確認した。また 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、今までシグナルの重なるのために NMR では帰属できなかったスペクトルの帰属に成功した。これにより、今まで構造解析が困難であった DNA の NMR スペクトルの帰属が容易になり、構造解析が可能となった。DNA の部位特異的安定同位体は、DNA とタンパク質の相互作用における 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容易に同定することが出来、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>

<p>施設利用に係る感想・改善等</p>	<p>NMR 装置の利用経験が少なくても、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。また、試料調製後は迅速にマシンタイムを確保してもらい、調整した試料をすぐに NMR 測定することができた。</p>
<p>「文部科学省の共用ナビ」に対する感想・改善等</p>	
<p>今後の利用希望等</p>	
<p>その他（上記項目以外での御意見等）</p>	

※ 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。