

北海道大学・先端 NMR ファシリティの共用促進プログラム 利用報告書

提出日 平成 29 年 6 月 26 日

利用機関名	旭化成株式会社	
利用者（実験責任者） 所属部署名・職名・氏名	原田佳宗（担当者）、橋本康博（責任者） 基盤技術研究所	
利用課題名	マイコプラズマ菌 L7/L12 と抗体の相互作用解析 肺炎球菌 L7/L12 タンパク質の立体構造解析	
利用区分	<input type="checkbox"/> トライアルユース <input checked="" type="checkbox"/> 成果非占有利用	
研究概要・目的	<p>細菌のタンパク質生合成の場であるリボソームは、複数のタンパク質群と RNA から構成されている。リボソーム構成因子のひとつである L7/L12 タンパク質は、細菌種間で幅広く保存されているものの、アミノ酸配列は異なっている。そのため、L7/L12 タンパク質の立体構造は細菌種間で差異があると考えられている。そこで、細菌種間での立体構造の差異を特異的に識別する抗体を作製し、細菌検査キットへの応用が試みられている。しかし、複数菌種の L7/L12 タンパク質の立体構造を解明して細菌種間の差異を詳細に解析した前例は無い。そこで、まず 2015 年度はマイコプラズマ菌の L7/L12 タンパク質の立体構造を解明した。</p> <p>2016 年度は、マイコプラズマ菌 L7/L12 とキットに用いる抗体との相互作用解析を行い、相互作用部位を特定する。次に、肺炎球菌の L7/L12 タンパク質の立体構造解明を目指し、マイコプラズマ菌の L7/L12 タンパク質立体構造との違いを解析し、診断キットの基礎技術開発を促進させる。</p>	
利用実施期間	平成 28 年 5 月 18 日～ 平成 29 年 3 月 31 日	
利用機器・利用時間	<p>■800MHz 溶液装置 (Unity INOVA) 利用時間 <u> 50 </u> 時間</p> <p>■800MHz 溶液装置 (AvanceIII HD) 利用時間 <u> 400 </u> 時間</p> <p>□600MHz 溶液装置 (AvanceIII HD) 利用時間 <u> </u> 時間</p> <p>□600MHz 固体装置 (JNM-ECA II) 利用時間 <u> </u> 時間</p>	
成果の概要	実施内容	<ul style="list-style-type: none"> ・マイコプラズマ菌 L7/L12 と抗体の相互作用解析 ・肺炎球菌 L7/L12 タンパク質の立体構造解析
	本課題により得られた	<ul style="list-style-type: none"> ・マイコプラズマ菌 L7/L12 と抗体の相互作用解析 <p style="margin-left: 20px;">当初は、抗体の分子量が 150,000 と非常に大きく NMR シ</p>

	<p>成果、当初目標と結果との比較</p>	<p>グナルがブロード化するため、^1H-^{15}N HSQC 滴定法では相互作用解析が不可能であると考えられていた。しかし、^1H-^{15}N HSQC 上で抗体と相互作用している L7/L12 タンパク質のアミノ酸残基のシグナルが、抗体結合によりブロード化（減衰）する現象を利用して相互作用解析が可能であることが分かった。この解析を通して、NMR に適さない高分子量タンパク質の相互作用解析技術を構築することができた。</p> <ul style="list-style-type: none"> 肺炎球菌 L7/L12 タンパク質の立体構造解析 <ul style="list-style-type: none"> 大腸菌による肺炎球菌 L7/L12 タンパク質の大量発現・精製技術を確立した (^{13}C, ^{15}N 標識)。 肺炎球菌 L7/L12 タンパク質の NMR 測定を行ったところ、N 末端ドメインの信号が微弱であり帰属が困難であった。そこで、N 末端ドメインと C 末端ドメインに分けて解析する技術を確立した。そして、C 末端ドメインの主鎖信号の 100%、側鎖信号の 95%を帰属することができ、NOE 情報により大まかな立体構造を得ることができた。 今後は、肺炎球菌 L7/L12 タンパク質の N 末端ドメインの帰属完了を目指す。
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>		<p>細菌感染症は進行が速く、1,2 時間で症状が急変し得るため、抗生物質を可能な限り迅速に投与することが重要である。しかし、投薬を急いで病原細菌を特定しないまま、効果の弱い抗生物質を誤投与してしまうと、耐性菌の出現を助長する危険性が考えられる。そのため、検査により原因菌を特定した後、原因菌に特異的に作用する抗生物質を投与することが望ましい。</p> <p>現在、細菌感染症の原因菌を特定するために、培養法と PCR 法が広く用いられているが、これらの手法は数時間～数日を要するため、投与する抗生物質を決定するための前検査としては不向きである。そこで、短時間で病原細菌を特定できる検査法が切望されていた。例えば、L7/L12 タンパク質に対する抗体を用いた感染症診断キット（イムノクロマト法）は、15 分以内の検査で病原細菌を特定することが可能である。したがって、抗生物質を正しく選択するための前検査として、また、病原細菌を完全に死滅させたかを診断するための検査</p>

	<p>として非常に有効であると期待されている。</p> <p>L7/L12 タンパク質の立体構造や、抗体との結合部位の情報は、診断キット開発の基礎的知見として非常に有用であると考える。</p>
成果公開時期の希望	<input type="checkbox"/> 即時公開可能 <input checked="" type="checkbox"/> 特許検討等のため延長（最大2年間）
利用に関する感想・希望	<p>測定の利便性も高く、また担当者からの懇切丁寧な測定・解析指導など、非常に感謝しております。</p>

本報告書は、印刷又は必要な編集・加工を行った上で公開します。また、別途各種報告会等において、本報告書の内容についての資料作成又は発表をお願いする場合があります。