

平成24年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 特別研究員奨励費 4. 研究期間 平成23年度～平成25年度

5. 課題番号

2	3	・	4	0	0	4	2
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 多様な微小管制御の構造生物学的アプローチ

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
	三島 (前崎)	バイオサイエンス研究科	特別研究員 (RPD)
	リョウコ		
	綾子		

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

(1) End-binding protein 1(EB1)とチューブリンとの弱い相互作用における構造学的研究
 EB1は、チューブリンのプラス端に結合し、チューブリンの伸長を促進する蛋白質である。NMRによる解析と共に、SPR等を用いて、EB1とチューブリンとの相互作用を調べた。まずEB1のCHドメインとC末端領域の解析から、CHドメインのチューブリン結合領域がEB1の末端のヘリックス領域と弱い相互作用をすることで、チューブリンとの相互作用を阻害していること明らかにした。また、チューブリンとCHドメインとの相互作用は、GMPCPP結合チューブリンよりも、GTP γ Sチューブリンの時に強くなった。これは、 β -チューブリンがGTP結合にともない構造変化を起こし、それをCHドメインが認識することを示している。これらの結果を論文に投稿した。

(2) チューブリンの発現系の構築及び変異体作成
 大腸菌で、安定なチューブリンの発現、精製を行う為に、重合を阻害する変異体の導入を行った。重合を阻害することにより、 α , β -チューブリンダイマーの精製が可能となれば、EB1との相互作用解析、複合体での立体構造解析を試みる予定である。

(3) リン酸化Protein kinase B(PKB)の発現精製
 昨年度習得したカイクを用いたタンパク質の発現・精製を用いて、PKBの精製を行った。発現系作成時、Dualベクターを用いることによって、同じベクター内に、活性化キナーゼであるPDK1を導入し、蛋白質の発現時にPKBの活性部位がリン酸化されるようにデザインした。このシステムを用いてPKBを高効率で調製することに成功した。

(4) この他、ヒトTTL1の立体構造解析、転写抑制共役因子SHARP/SMRT複合体の立体構造解析とその相互作用解析に向けた研究も行った。

10. キーワード

- | | | | |
|--------------|---------|------------|---------|
| (1) 微小管制御蛋白質 | (2) 複合体 | (3) チューブリン | (4) NMR |
| (5) 動的構造解析 | (6) | (7) | (8) |

11. 現在までの達成度

下欄には、交付申請書に記載した「研究の目的」の達成度について、以下の区分により自己点検による評価を行い、その理由を簡潔に記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。
 <区分>①当初の計画以上に進展している。 ②おおむね順調に進展している。 ③やや遅れている。 ④遅れている。

(区分) ②おおむね順調に進展している。
(理由) EB1 とチューブリンとの相互作用に関する研究については、EB1 の自己阻害やチューブリンの相互作用領域に関する論文をまとめることができた。大腸菌を用いたチューブリン発現系の確立については、現在、変異を導入することにより、重合を阻害するチューブリンの発現、精製に向けて研究を進めている。この発現系の確立に成功すれば、さらに詳しく EB1 との相互作用を解析することができる。また、TTL についても一残基変異を導入することにより、劇的に安定性を向上することができており、次年度は立体構造解析を進めることができる。

12. 今後の研究の推進方策

本研究課題の今後の推進方策について簡潔に記述すること。研究計画の変更あるいは研究を遂行する上での問題点があれば、その対応策なども記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

チューブリンについては、重合することが問題となり、相互作用蛋白質との詳細な相互作用解析や複合体での立体構造解析を進めることが難しくなっている。そこで、現在、重合を阻害するチューブリン蛋白質の発現系の確立を試みており、これに成功すれば、チューブリンと相互作用する蛋白質と複合体の立体構造解析や詳細な相互作用の解析を進めることができる。 TTL については、蛋白質の安定性が低く、大腸菌での発現、精製が難しかったが、一残基変異を導入することにより、安定なタンパク質を精製することができるようになった。この蛋白質を用いて、NMR を用いた動的構造解析に向けた実験を行っていく。
--

13. 研究発表（平成24年度の研究成果）

※ 「13. 研究発表」欄及び「14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況」欄において記入欄が不足する場合には、適宜記入欄を挿入し、それによりページ数が増加した場合は、左端を糊付けすること。

【雑誌論文】 計（ 1 ）件 うち査読付論文 計（ 1 ）件

著者名	論文標題						
Kanaba T, Maesaki R, Mori T, Ito Y, Hakoshima T, Mishima M.	Microtubule-binding sites of the CH domain of EB1 and its autoinhibition revealed by NMR.						
雑誌名	査読の有無	巻	発行年			最初と最後の頁	
<i>Biochim Biophys Acta.</i>	有	1834	2	0	1	3	499-507
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)							
10.1016/j.bbapap.2012.10.013							

著者名	論文標題						
雑誌名	査読の有無	巻	発行年			最初と最後の頁	
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)							

著者名	論文標題						
雑誌名	査読の有無	巻	発行年			最初と最後の頁	
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)							

【学会発表】計（ 4 ）件 うち招待講演 計（ 0 ）件

発表者名	発表標 題		
秋吉 克昂	NMR法によるマルチドメインタンパク質Protein kinase C の構造解析に向けた種々の試み		
学会等名	発表年月日	発表場 所	
第12回 日本蛋白質科学会年会	2012年6月21日	名古屋国際会議場	

発表者名	発表標 題		
秋吉 克昂	NMRによるマルチドメインタンパク質PKCの構造解析		
学会等名	発表年月日	発表場 所	
第51回 NMR討論会	2012年11月8日	ウインクあいち	

発表者名	発表標 題		
金場 哲平	溶液NMR法を用いたEB1の自己阻害及び活性化機構の構造研究		
学会等名	発表年月日	発表場 所	
第35回日本分子生物学会年会	2012年12月11日	福岡国際会議場 マリンメッセ福岡	

発表者名	発表標 題		
秋吉 克昂	NMRによるマルチドメインタンパク質Protein kinase C全長の構造解析		
学会等名	発表年月日	発表場 所	
第35回日本分子生物学会年会	2012年12月11日	福岡国際会議場 マリンメッセ福岡	

【図 書】 計（ 0 ）件

著 者 名	出 版 社		
	書 名	発 行 年	総ページ数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【出 願】 計（ 0 ）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

【取 得】 計（ 0 ）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

--