

様 式 F - 7 - 1

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 27 年度）

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 基盤研究(C)（一般） 4. 補助事業期間 平成 27 年度～平成 29 年度

5. 課題番号 

1	5	K	0	6	9	7	2
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 金属耐性に関わる輸送体膜タンパク質の構造基盤の解明

## 7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
1 0 6 3 2 3 3 3	タナカ ヨシキ 田中 良樹	バイオサイエンス研究科	助教

## 8. 研究分担者

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

金属イオンは生命活動に必須であり、細胞質の金属イオン濃度は厳密に制御されている。植物細胞においてZn, Fe, Mn, Cdイオンの排出を担い、金属耐性に関わるのがMTPファミリーである。本研究では、高い金属集積能力を有する植物由来のMTPの結晶構造解析と立体構造を利用した機能解析を目指している。大量発現系を構築、結晶化に必要な高純度のサンプル精製系を確立し、LCP法による結晶化を試みた。得られた結晶について放射光施設で回折実験を行ったが、解析可能なデータを得るためには結晶の質・量の改善が必要である。抗体等の結晶化を補助する分子の探索やbicelle法など他の結晶化方法を試して結晶化条件の検討を進めている。

## 10. キーワード

(1) タンパク質	(2) イオン輸送	(3) 膜タンパク質	(4) X線結晶構造解析
(5) 構造生物学	(6)	(7)	(8)

## 11. 現在までの進捗状況

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

結晶化に必要な量のサンプルを発現させ、高純度に単離する系を確立した。しかし、構造解析可能な結晶の作成には至っていないため、LCP法・bicelle法・HiLiDe法など膜タンパク質結晶化方法を含め、結晶化スクリーニングを繰り返し行っていく。同時に結晶化の補助になる抗体等の結合分子の探索も行い、共結晶化により結晶化を促進する方法も同時に進行させている。

## 12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

大量精製系は完成しているので、結晶化条件の探索を網羅的に行っていく。膜タンパク質用の各種結晶化手法を導入や、結晶化を補助する分子を作成し共結晶化を行う予定である。回折実験は微小結晶からの測定が可能なマイクロフォーカスビームラインSPring-8 BL3 2XUを用いる。また、状況によってはより強力なX線光源であるX線自由電子レーザー-SACLAの利用も検討し、構造決定を目指す。さらに輸送の各状態の構造を決定し、輸送における構造変化を可視化していく。輸送制御や特異性を認識する部位が輸送体に存在すると考えられており、基質の有無や種類を変更し構造解析を行うことで構造機能関連の解明を目標とする。構造に加えて、機能解析を進める。具体的には人工脂質二重膜へ再構成し、イオンに反応する蛍光色素や電気生理学的手法を用いた解析、過剰発現細胞(酵母・植物培養細胞)の重金属感受性の変化を観察する方法などが考えられる。構造情報に基づく解析を行うことで、一塩基多型による輸送基質変化の仕組みなど、輸送メカニズムの解明を目指す。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

初期スクリーニングで得られた結晶から期待していた回折像を得られず、予定していたよりも結晶化以前の小規模スクリーニングを行うことが多かったため。

(使用計画)

結晶化のための大量のサンプル調製と同時に、結晶化を促進する抗体の作製を行っていくために使用する。

(課題番号： 15K06972 )

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

## 13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(1)件/うち査読付論文 計(1)件/うち国際共著 計(0)件/うちオープンアクセス 計(1)件

著者名		論文標題				
Yoshiki Tanaka, Yasunori Sugano, Mizuki Takemoto, Takaharu Mori, Arata Furukawa, Tsukasa Kusakizako, Kaoru Kumazaki, Ayako Kashima, Ryuichiro Ishitani, Yuji Sugita, Osamu Nureki and Tomoya Tsukazaki		Crystal structures of SecYEG in lipidic cubic phase elucidate a precise resting and a peptide-bound states				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Cell Reports	有	13	2015	1561 1568	-	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1016						
オープンアクセス						
オープンアクセスとしている(また、その予定である)						

(学会発表) 計(5)件/うち招待講演 計(0)件/うち国際学会 計(2)件

発表者名		発表標題	
田中 良樹		新生膜タンパク質の膜組み込み過程の構造生物学	
学会等名	発表年月日	発表場所	
新学術領域研究「新生鎖の生物学」平成27年度第2回班会議	2015年11月14日	ほほえみの宿(山形県天童市)	

発表者名		発表標題	
Yoshiki Tanaka, Yasunori Sugano, Mizuki Takemoto, Takaharu Mori, Arata Furukawa, Tsukasa Kusakizako, Kaoru Kumazaki, Ayako Kashima, Ryuichiro Ishitani, Yuji Sugita, Osamu Nureki and Tomoya Tsukazaki		Complete and peptide-bound structures of the Sec translocon	
学会等名	発表年月日	発表場所	
新学術領域研究「動的秩序と機能」第4回公開国際シンポジウム(国際学会)	2015年11月22日	九州大学西新プラザ(福岡県福岡市)	

発表者名	発表標題	
田中 良樹, 塚崎 智也*, 古川新, 菅野泰功	新生膜タンパク質の膜組込み過程の構造生物学	
学会等名	発表年月日	発表場所
新学術領域研究「新生鎖の生物学」平成27年度第一回班会議	2015年06月13日	東京工業大学(東京都港区)

発表者名	発表標題	
Tomoya Tsukazaki, Kaoru Kumazaki, Shinobu Chiba, Mizuki Takemoto, Arata Furukawa, Toshiki Kishimoto, Yasunori Sugano, Takaharu Mori, Yoshiki Tanaka, Yuji Sugita, Koreaki Ito, Ryuichiro Ishitani and Osamu Nureki	Structures of Membrane Protein Insertase YidC	
学会等名	発表年月日	発表場所
Structural Biological Dynamics: From Molecules to Life with 60 trillion Cells (国際学会)	2015年11月05日	東京大学(東京都文京区)

発表者名	発表標題	
Yoshiki Tanaka, Yasunori Sugano, Mizuki Takemoto, Takaharu Mori, Takamitsu Haruyama, Arata Furukawa, Tsukasa Kusakizako, Kaoru Kumazaki, Ayako Kashima, Ryuichiro Ishitani, Hiroki Konno, Yuji Sugita, Osamu Nureki and Tomoya Tsukazaki	Cytoplasmic conformational transition of Sec translocon	
学会等名	発表年月日	発表場所
第53回日本生物物理学会年会	2015年09月13日 ~ 2015年09月15日	金沢大学(石川県金沢市)

(図書) 計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

(課題番号: 15K06972)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(4/5)

## 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. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

## 16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究: -

## 17. 備考

--