

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 2 8 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 2 7 年度～平成 2 9 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

初年度の時点で、サンプルの大量発現および精製方法の確立と結晶化スクリーニングにより予備的な結晶の作製を行っていた。二年度目では、得られた結晶を用いて大型放射光施設での回折実験を行った。複数の条件の結晶で回折像を取得したが、いずれも極度に異方性があることが分かり、構造決定には至らなかった。そこで、結晶パッキングの改善を狙って、抗体（Fab,Fc）を結合させる方法をとることにした。発現ベクターに抗体認識配列を付加、融合タンパク質として大量発現させ、精製後に抗体と混合して結晶化サンプルとした。抗体複合体状態での結晶化を行ったところ、針状の結晶を得ることが出来た。これについて放射光施設での回折実験を進めた結果、予備的な低分解能データを得た。抗体構造を用いた分子置換を試したが、解は得られなかった。異方性の問題は改善されているため、抗体複合体での結晶化リファインを進める他、重原子との共結晶も試して構造決定のための準備を進めた。

10. キーワード

(1) 構造解析	(2) 膜タンパク質	(3) 輸送体	(4)
(5)	(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)

前年度の段階で得られた結晶を用いて大型放射光施設での回折実験を行った。複数の条件の結晶で回折像を取得したが、いずれも極度に異方性があることが分かり、構造決定には至らなかった。そこで、結晶パッキングの改善を狙って、抗体を結合させる方法をとることとした。発現ベクターに抗体認識配列を付加、融合タンパク質として大量発現させ、精製後に抗体と混合して結晶化サンプルとした。抗体複合体状態での結晶化を行ったところ、針状の結晶を得ることが出来た。これについて放射光施設での回折実験を進めた結果、予備的な低分解能データを得た。抗体構造を用いた分子置換を試したが、解は得られなかった。異方性の問題は改善されているため、抗体複合体での結晶化リファインを進める他、重原子との共結晶も試して構造決定のための準備を進行中である。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

本年度は、引き続き結晶構造解析を進める。抗体複合体結晶を使って回折実験を行い、データ収集を行う。位相決定は、第一に抗体構造を利用した分子置換である。また、解析対象が金属輸送体であることから、金属親和性が高いと期待されることを利用し、重原子との共結晶化による異常分散を利用した位相決定も可能なように測定を行う。構造決定に成功次第、変異体解析など構造に基づいた解析を行って、論文にまとめて発表する。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

論文投稿や学会等での発表にまで進まなかったため、旅費や論文作成に関わる諸費用が予定していたものよりも少なくなった。また、タンパク質の結晶化を促進するための抗体の作製を考慮していたが、既存の抗体と抗原タグの組み合わせによって結晶が得られたため、費用が少なくなった。

(使用計画)

結晶化温度検討をより詳細に行っていくために、恒温インキュベーターの複数機導入を計画している。構造決定までには更なる結晶の量産が必要であると考えられるので、精製に使用する試薬や結晶化消耗品が必要である。成果がまとまり次第、論文化し、成果発表を行うための学会参加費用などに使用する。

(課題番号 : 15K06972)

(注) ・印刷に当たっては、A 4 判 (縦長) ・両面印刷すること。

13. 研究発表（平成 28 年度の研究成果）

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

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	国際共著
			<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> </div> <div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> </div> </div>		
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）					
オープンアクセス					

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

発 表 者 名	発 表 標 題	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所

〔図書〕 計（ 0 ）件

著 者 名	出 版 社	
書 名	発行年	総ページ数
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> </div> <div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; height: 15px; width: 10px;"></div> </div> </div>	

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

--