

平成23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
	シマ(マエサキ) リョウコ	バイオサイエンス研究科	特別研究員(RPD)
	三島(前崎) 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) TTLの立体構造解析に向けて、TTLのコンストラクトの最適化を行い、NMR測定で良好な結果が得られるコンストラクトを作成した。今年度はじめまでに、いくつかのコンストラクトを作成し、NMRスペクトルの改善も見られていたが、NMRを用いた構造解析を成功させるためには、より、高純度、高濃度の精製タンパク質が必要であった為、さらにコンストラクトの最適化を行った。ランダムミューテーションを行うなどして、多数のコンストラクトの作成を行ったが、最終的には、2011年10月にnature structural & molecular biology に立体構造が報告された **Xenopus** の配列を参考にして、数か所に変異を入れることにより、高純度、かつ高濃度に濃縮できる **human TTL** の精製に成功した。今後、このサンプルを用いて、NMRを用いた動的構造解析を行う予定である。

(2) Tubulinの発現系の構築及びタンパク質の培養、精製を行った。
 α -tubulin と β -tubulin を共発現させることにより、大腸菌でのTubulinの発現を試みた。
 α -tubulin, β -tubulinを共発現させ、低温で発現誘導をかけて培養、tubulinの重合、脱重合を繰り返すことによって、少量のtubulinの精製に成功した。現在のところ、tubulinの発現状態は非常に良いが、大腸菌の破碎段階で、沈殿してしまう割合が非常に高い。今後、発現過程でのtubulinのアセチル化や発現条件、大腸菌の破碎条件などを検討して、高純度、高収量でtubulinを精製できるよう改善していきたい。

10. キーワード

- | | | | |
|---------|-------------|---------|------------|
| (1) TTL | (2) tubulin | (3) NMR | (4) 動的構造解析 |
| (5) | (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) TTL の立体構造解析に向けて、human TTL に数か所の変異を入れることにより、NMR を用いた立体構造解析に十分な、高純度、高濃度の精製タンパク質の精製方法を確立した。Tubulin 発現系の構築については、大腸菌の培養方法、精製方法を検討した結果、 α,β -tubulin を共発現させることによって、少量ではあるが、 α,β -tubulin を精製できるようになった。次年度の構造解析に向けて、おおむね順調に進展している。

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。

TTL については、現在までに確立した手法を用いて、タンパク質の培養、精製を行い、高純度、高濃度のタンパク質を大量に精製する。今後は、NMR を用いた動的構造解析に向けた実験を行っていく。
Tubulin については、大腸菌での α,β -tubulin の共発現により、タンパク質が大量に発現できていることは確認できているが、大腸菌破碎後の α,β -tubulin の多くが沈殿してしまっている。今後は、tubulin のアセチル化酵素を共発現させる、発現条件をさらに改善するなどの検討を行い、高純度の α,β -tubulin を大量に精製できるよう、研究を進めていく。

13. 研究発表（平成23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 (0) 件 うち査読付論文 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
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)						

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		
金場 哲平	微小管ダイナミクスを制御する蛋白質群についての構造研究		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第11回日本タンパク質科学学会年会	2011年6月8日	ホテル阪急エキスポパーク	

発表者名	発表標題		
Kunimichi Saeki	Structural studies of tubulin tyrosine ligase 1		
学会等名	発表年月日	発表場所	
ISNMR 2011	2011年11月16日	大棧橋ホール	

発表者名	発表標題		
Teppey Kanaba	Autoinhibition and activation of end-binding 1 revealed by NMR		
学会等名	発表年月日	発表場所	
ISNMR 2011	2011年11月16日	大棧橋ホール	

発表者名	発表標題		
秋吉 克昂	溶液NMR法を用いた全長Protein kinase Cの構造決定の試み		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第34回日本生物物理学会年会	2011年12月14日	パシフィコ横浜	

【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。

--