

理研NMR施設成果非占有利用報告書

08-200-009

利用機関名	神戸大学	
実施部署名	大学院医学系研究科・構造生物学分野	
実施責任者管理職名・氏名	特命教授 廣明秀一	
実施部署所在地		
実施部署連絡先		
利用課題名 (利用目的)	細胞接着装置構成タンパク質の構造生物学的研究(ターゲットタンパクプログラム・基本的な生命の解明・課題A)	
利用実施時期及び期間	平成20年9月29日午後～11月4日午前 総利用日数：2週間 当初計画どおり	
利用施設	NMR装置 (該当部分)	<p>利用装置</p> <p>・()600MHz、()700MHz、()800MHz、()900MHz ()低温プローブ付 ()固体プローブ付 ()サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間1:平成20年9月29日午後～平成20年10月6日午前(1週間) 利用期間2:平成20年10月28日午後～平成20年11月4日午前(1週間)</p> <hr/> <p>利用装置</p> <p>・()600MHz、()700MHz、()800MHz、()900MHz ()低温プローブ付 ()固体プローブ付 ()サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間1:平成 年 月 日～平成 年 月 日 利用期間2:平成 年 月 日～平成 年 月 日</p>

		利用期間 3 : 平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日
		利用装置 ・ ()600MHz、()700MHz、()800MHz、()900MHz ()低温プローブ付 ()固体プローブ付 ()サンプルエンジェー付
		利用期間 1 : 平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日
		利用期間 2 : 平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日
		利用期間 3 : 平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日
立体構造解析 パイプ ライン	・ 発現確認 : 利用回数 回	
	・ フォールド判定 : 利用回数 回	
	・ 大量調製 : 利用回数 回	
	・ 構造決定 : 利用回数 回	
利用満足度 (複数選択不可)	()大いに満足、()ほぼ満足、()やや不満、 ()大いに不満	
成果の概要	実施内容	<p><i>実際に行った作業の概要について記載してください。</i></p> <p>1 . 細胞接着装置構成タンパク質の一つ、Z01 の C 末端ドメインから新規ドメイン ZU5 を単離し、高濃度の二重標識試料(0.6mM)を調製した。主鎖帰属を目的として、一連の 3 次元 NMR 測定を計画したが、濃縮中に試料のアグリゲーションが起こり、2 次元 HSQC 測定の段階で、想定外のシグナル広幅化が観測された。</p> <p>3 次元測定を断念し、希釈・塩強度調製などによる 3 次元測定のための条件探索を行った。</p> <p>2 . 細胞接着装置の構成因子をモデルとして設計された人工コイルドコイル蛋白質二種類について、HSQC 測定を行い、設計の可否を確認した。</p> <p>3 . 細胞接着装置構成タンパク質の一つ、Z01 の PDZ1 ドメインについて、リン脂質誘導体である phytic acid 存在下での、主鎖シグナル帰属を進めるための、一連の 3 次元 NMR の測定を行った。</p> <p>4 . 細胞接着装置構成タンパク質の一つ、AF6 の PDZ ドメインについて、基質である peptide による NMR 滴定実験を行った。</p>

<p>本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較</p>	<p><i>本課題実施の結果得られた成果および当初目標に対する達成度などについて記載してください。</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ・当初目標では、Z01-ZU5 ドメインの主鎖シグナル帰属と NMR 立体構造決定を積極的に進める予定であったが、薄い濃度の試料での HSQC が理想的な挙動を示していたにもかかわらず、二重標識試料調製によりアグリゲーションを観察した。このことについて、測定予定期間中に問題解決のめどがたたなかったため、次回以降に先送りすることにし、持ち帰って検討することとした。 ・AF6 の PDZ ドメインについて、基質である peptide による NMR 滴定実験を行ったところ、想定以上の強い結合が観察されたので、今後複合体での立体構造が可能となった。 ・phytic acid 存在下での、Z01-PDZ1 主鎖シグナルは順調に進行中である。
<p>今後の展開、課題</p>	<p><i>本課題の結果を踏まえた今後の展開方針および目的達成に向けた今後の課題などについて記載してください。</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ・前述のように、Z01-ZU5 は、塩濃度などの小手先の条件検討では、立体構造決定可能な理想的な NMR 試料が得られなかった。H20 年度中に、神戸大においてコンストラクトの再設計などが行われ、より溶解度が高い試料の発現系 3 種が得られたので、現在 DLS など条件検討中である。 ・Z01-PDZ1 について、リン脂質アナログである phytic acid 結合部位と、ペプチドリガンドの結合部位が空間的にオーバーラップしている可能性が示唆された。このことは、BIACORE 実験において、phytic acid によりペプチド結合が阻害されるという実験結果と整合性が高い。今後、この分子機構の生理的意味について、細胞生物学的に解明する予定である。
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>() あり : () なし 「あり」の場合理由：</p>

<p>利用における感想 (改善要望等を含む)</p>	<p><i>本施設を利用して良かった点、改善してほしい点、提案事項など、施設利用の感想を記載してください。</i></p> <p>特になし。</p> <p>それぞれの NMR 装置について、その装置固有の癖なども含めて、装置固有の NMR 測定に必要なパラメータなどの提供が過不足なく行われており、外部利用していて非常にストレスなく測定ができた。</p> <p>理研外部とのデータのやりとりに関しては、理研外部から sFTP などデータを読み上げるような方法があると、3D-NMR 測定終了後に遠隔地から測定の成否が確認できて、より研究のスピードアップにつながると思われる。</p>
<p>利用周辺環境に関する希望</p>	<p>NMR 条件検討がオンサイトで行えるような環境、たとえば、自動微量透析装置や透析用のビーカーなどの設置場所などが利用できれば、予定しておいた研究が試料の性質のせいでキャンセルにならないので、非常に助かる。</p>
<p>今後の利用形態の予定</p>	<p>() 成果の非公開を前提とした「外部利用」(有料)を考えている。</p> <p>() その他理研との共同研究等</p> <p>具体的に</p> <p>次期課題申請においても、成果非占有利用の継続を希望する。理研との共同研究に関しても前向きに考えたい。</p>
<p>今後期待するその他のサービス</p>	<p>() NMR 装置利用の教育(これまで NMR を使用した経験の無い方に対する教育も含む)</p> <p>() NMR 装置利用の技術的なサポート</p> <p>() その他</p> <p>具体的に</p> <p>特になし</p>

その他	(上記の項目以外でご意見等お願いします。) 成果報告会・シンポジウムにおいて、依頼があれば発表の意思あり。
-----	--

本報告書については、印刷または必要な編集・加工を行った上で公開します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての資料作成または発表をお願いする場合があります。

特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は必ず事前にご相談ください。