

理研NMR施設成果非占有利用報告書

08-200-010

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/膜生物学分野/脂質生化学分野	
実施責任者管理職名・氏名	特命教授 廣明秀一（構造生物学分野） 准教授 伊藤俊樹（膜生物学分野） 助教 伊集院壮（脂質生化学分野）	
実施部署所在地		
実施部署連絡先		
利用課題名（利用目的）	生体膜高次構造の変換にかかわるタンパク質ドメインの分子機構解明	
利用実施時期及び期間	平成 20 年 10 月 14 日午後～平成 20 年 11 月 25 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 (該当部分に)	<p>利用装置</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ()600MHz、()700MHz、()800MHz、()900MHz ()低温プローブ付 ()固体プローブ付 ()サンプルレンジャー付 <p>利用期間 1：平成 20 年 10 月 14 日午後～平成 20 年 10 月 20 日午前（1 週間）</p> <p>利用期間 2：平成 20 年 11 月 17 日午後～平成 20 年 11 月 25 日午前（1 週間）</p> <hr/> <p>利用装置</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ()600MHz、()700MHz、()800MHz、()900MHz ()低温プローブ付 ()固体プローブ付 ()サンプルレンジャー付 <p>利用期間 1：平成 年 月 日～平成 年 月 日</p>

		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
		利用装置 ・ ()600MHz、()700MHz、()800MHz、()900MHz ()低温プローブ付 ()固体プローブ付 ()サンプルヘンジャー付 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) 膜高次構造を変換するタンパク質群の一つとして、一型 AAA-ATPase である Vps4b の研究を行った。具体的には、Vps4b の MIT ドメインに対して、ESCRT-III 複合体由来ペプチドとその誘導体を用いて、NMR 測定実験を行った。</p> <p>2) 膜変換酵素由来 SKITCH 由来新規ドメインの構造解析ターゲットとしての feasibility test を HSQC 測定によって行った。</p> <p>3) 免疫応答シグナリングに関連する蛋白質 NEMO から単離された、ユビキチン結合型新規 Znf ドメインの構造決定のための 3D 測定を行った。</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> <p>1) Vps4b の MIT ドメインに対して、ESCRT-III 複合体由来ペプチドとその誘導体を用いて、NMR 滴定実験を行ったところ、二種類のペプチドについて Vps4b-MIT 側のインタフェースが決定できた。しかし、結合アフィニティーは期待したほど強くなく、複合体での立体構造決定を行うためには、さらにアフィニティーのつよいペプチドをデザインする必要があることがあきらかになった。</p> <p>2) NEMO 由来 ZnF について、立体構造決定が完了した。</p> <p>3) その他の膜変換タンパク質である Fer および SH3YL2 由来のドメインに関しては、試料調製の都合上、NMR 測定可能な試料がえられなかった。</p>
<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> <p>1) Vps4b-MIT ドメインについて、ペプチドが結合するインタフェースが決定できた意義は極めて大きい。</p> <p>2) NEMO 由来 ZnF について、立体構造決定ならびに Ub 結合ドメインの決定が完了したものの、フランス Agou らのグループに先行されたため、論文発表には至らなかった。エクソサイトーシスに関わり緑内障原因遺伝子である OPTN の ZnF ドメインが、NEMO と構造的に相同であるという予測結果があり、今後、OPTN の解析を進めることで論文発表を目指す。</p> <p>3) 膜高次構造の変換と制御にかかわるタンパク質群には、コイルドコイルドメインや、多量体を形成する傾向の強いドメインが多く、NMR 測定可能な試料を調製するまでに多くの試行錯誤を要する。当研究室が開発した PRESAT-vector システムが必ずしも有効に稼働しているわけではなく、今後の改善点としたい。</p>
<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>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、外部利用して非常にストレスなく測定ができた。 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。 () その他理研との共同研究等 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) () NMR 装置利用の技術的なサポート () その他 具体的に 特になし。</p>
<p>その他</p>	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p> <p>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。 将来、関連成果の論文発表時に、理研 NMR 施設成果非占有利用制度に対する謝辞を入れたい。定型文があれば教えてほしい。</p>

--	--

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。