

1 - 3 - 2 研究成果

<p>中テーマ名：DNA結合タンパク質同定装置の開発 サブテーマ名：DNA結合タンパク質の構造解析を通じたDNA結合同定新技術の検証</p>	
<p>中テーマリーダー（所属、役職、氏名） 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授 西村善文</p> <p>研究従事者（所属、役職、氏名） （財）木原記念横浜生命科学振興財団 奥田昌彦 岡村英保 野村 充 大野綾子</p>	
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>研究の概要</p> <p>(1) 核内タンパク質である基本転写因子の機能未知なドメインの立体構造をNMRを用いて決定する。 (2) 大腸菌転写因子PhoBのDNA結合ドメインを用いて、その立体構造およびDNAとの複合体の立体構造を共に溶液中で解析する。さらに主鎖および側鎖のNMRシグナル緩和を調べて原子レベルのダイナミクスを調べる。また、分子レベルのPhoBの転写因子として機能を調べるためにPhoBの全長をNMRで解析をする。</p> <p>研究の独自性・新規性</p> <p>(1) 基本転写因子のタンパク質ファミリーで最初となるドメインの立体構造を決定する。決定された構造や他の実験から機能を推定し同定する。 (2) NMRでは溶液中であるので蛋白質の柔軟性などの性質をより生体内に近い状況で観測できる。このことを利用して原子および分子レベルのダイナミクスを調べて、その機能との相関を調べることは生体高分子の理解を深めることになり、今後、有用な基礎データとなるであろう。</p> <p>研究の目標</p> <p>フェーズ Ⅰではタンパク質 - タンパク質複合体のサーベイとその複合体の構造を解析する。 フェーズ Ⅱではタンパク質 - タンパク質複合体の構造解析を通じたNMR新技術の検証を行う。 フェーズ Ⅲでは複合体の立体構造の応用法も含めた特許出願と更なるタンパク質 - タンパク質複合体の探索を行う。</p>	
<p>研究の進め方及び進捗状況</p> <p>(1) ドメインをコードする遺伝子は共同研究者から提供されたもの、あるいは自分自身でサブクローニングした。大腸菌での発現方法、および精製方法を確立後、¹⁵N標識試料を調製し溶解度、構造保持しているか等を調べた。構造解析が可能なものに対しては、¹³C, ¹⁵N標識試料および非標識試料を調製し、多次元NMR測定を行った。スペクトルを解析し水素間距離や二面角度制限情報等を収集し、構造計算を行った。初期構造が得られたら、妥当な精度を満たす最終立体構造が得られるまで精密化を繰り返した。立体構造決定後、構造を詳細に解析し機能に結びつく知見を収集した。推定された機能について、それを証明するための種々の実験を行った。</p> <p>(2) NMR解析により大腸菌転写因子PhoBのDNA結合ドメインとDNAの複合体の立体構造を求めた。さらに、主鎖、側鎖のNMR緩和測定により、PhoBのDNA結合ドメインの単体およびDNAの複合体中の原子レベルでのナノ秒からピコ病オーダーでの運動性を調べた。それらはDNA結合や転写活性化などの機能と良く一致するものであった。またこれらのデータは計算科学的な手法によっても解析を試みている。PhoBの転写因子としての機能を調べるために、PhoBの全長を色々な条件下でNMR測定により調べた。具体的にはPhoBの活性化、不活性化によるシグナル変化、さらにそれらのDNAへの結合様式を調べることによりPhoBの転写メカニズムが推定できた。そのメカニズムは、全く新しい機構を示唆するものであった。</p>	
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容：</p> <p>(1) 基本転写因子TFII Eについて、2つのドメインの立体構造を決定した。立体構造からそれぞれのドメインの機能的役割を示した。 (2) PhoBについては論文投稿準備中である。</p> <p>特許件数：3 論文数：27 口頭発表件数：34</p>	

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

(1) 国際雑誌に論文が受理されたので、相応の水準を満たしていると考ええる。
 (2) 主鎖，側鎖のNMR緩和測定によるPhoBのDNA結合ドメインのダイナミクスに関して、特に側鎖のダイナミクスには他のタンパク質においても国内では報告例がなく、国外においてもPhoBもしくはその複合体程度の大きさのものでは特に少ないものである。従って、タンパク質一般の理解に関連しても有用であると考ええる。PhoBの全長の解析に関して、PhoB様のタンパク質は原核生物の最も一般的な転写因子群の一つであるが、その転写メカニズムはあまりよくわかっていない。その理由の一つは全長のタンパク質の解析が困難なことである。今回、PhoBの全長を色々な状況下において溶液NMRで観測することにより、明快な形で転写メカニズムを調べることができた。

2 実用化に向けた波及効果

PhoBの転写メカニズムの解明は原核生物の転写を制御する方法が示唆されており、産業利用への期待が望める。

	JST負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計	
	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計		
人件費	237	4,692	4,714	7,960	8,791	5,217	31,611	0	0	0	0	0	0	0	0	31,611
設備費	22,450	23,956	20,639	17,496	20,438	14,905	119,884	50,857	0	0	0	0	0	50,857	170,741	
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	1,007	5,773	12,042	3,906	3,734	4,026	30,488	0	1,560	2,004	1,862	2,401	1,544	9,371	39,859	
旅費	14	28	219	109	54	18	442	0	0	0	0	0	0	0	442	
その他	0	16	47	19	26	4	112	0	0	0	0	0	0	0	112	
小計	23,708	34,465	37,661	29,490	33,043	24,170	182,537	50,857	1,560	2,004	1,862	2,401	1,544	60,228	242,765	

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST負担による設備：イナート高速液体クロマトグラフ、マルチビーズショッカー

地域負担による設備：

複数の研究課題に共通した経費については按分する