

## 研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		弱い相互作用に支配されるマルチドメイン蛋白質の構造解析			
研究テーマ (欧文) AZ		Structural analysis for a multi-domain protein governed by weak interactions			
研究氏 代表名 者	カタカナ CC	姓) ミシマ	名) マサキ	研究期間 B	2010 ~ 2012 年
	漢字 CB	三島	正規	報告年度 YR	2012 年
	ローマ字 CZ	MISHIMA	MASAKI	研究機関名	首都大学東京
研究代表者 CD 所属機関・職名		首都大学東京・准教授			
概要 EA (600字~800字程度にまとめてください。)					
<p>生命現象を物理化学的に理解するためには蛋白質の立体構造決定が必要である。近年の結晶構造解析技術の発展によりその構造決定の報告は飛躍的に増大したものの、マルチドメインで構成され、構造が柔らかな蛋白質では結晶化が未だ困難であることが多い。そこで本研究では異種核多次元核磁気共鳴(NMR)法を用いて、蛋白質内部の常磁性緩和効果を観測することで、柔らかなマルチドメイン蛋白質の構造解析の手法の確立を目指している。</p> <p>マルチドメイン蛋白質として Protein kinase C <math>\alpha</math> (PKC<math>\alpha</math>) をターゲットとして研究を行った。PKC<math>\alpha</math>は全長で自己阻害状態になっていると生化学的な解析から考えられているが、実際の構造解析に基づく知見はない。まず我々は、全長の PKC の再構成を目指し、各ドメインである C1A、C1B、C2、kinase、また、タンデム C1BC2、タンデム C1A-C1B-C2 領域の発現と精製を行った。溶解性を向上させる変異を導入することで、従来、大腸菌の発現系では調製ができなかった C1A ドメインの NMR 測定に成功した。この試料を用いて、diacylglycerol (DAG)との相互作用部位を同定した。また Cho らによって、モデリングや間接的なデータから提唱されていた C1A と C2 ドメインの相互作用を、NMR を用いて実際に検出することに成功した。今後、他のドメイン間相互作用の検討も行う。さらに蛋白質連結反応をもちいて、各ドメインを連結することで全長 PKC<math>\alpha</math>を再構成し、常磁性緩和効果による距離情報からの構造決定を行っていききたい。</p>					
キーワード FA	NMR	マルチドメイン蛋白質	PKC		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA									
研究機関番号 AC					シート番号									

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

欧文概要 EZ

Structural determination of a multidomain protein consists of inter-domain flexible linkers and weak intramolecular interactions is an interesting issue but it is often technically difficult. Protein kinase C alpha (PKC $\alpha$ ), a multidomain protein, locates at cytoplasm in an auto-inhibited state by inter domain interactions. When PKC $\alpha$  is activated by second messengers, Ca<sup>2+</sup> and diacylglycerol (DAG), PKC $\alpha$  adopts a large conformation change and localizes at plasma membrane, and thus phosphorylates cognate substrates. As a first step of obtaining structural information of full length PKC $\alpha$ , we have prepared each domain. Especially, we have succeeded in preparation of C1A domain using E. coli expression system. We also investigated the DAG binding site of C1A domain. We plan to reconstitute full length PKC $\alpha$  by ligation reaction, and will also discuss usage of PRE derived from spin labeling to obtain long-range distance information.