

提出日：平成 29 年 5 月 16 日

平成 28 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	DNA 複製に関わるタンパク質群の精密構造解析		
研究代表者	氏名	大山 拓次	
	所属機関名・部局名	山梨大学大学院・総合研究部	
	職名	准教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	蛋白質結晶学研究室 教授 栗栖源嗣		
<p>DNA 複製において、クランプとクランプローダーは DNA ポリメラーゼなど DNA のプロセッシングに関わるタンパク質群の機能を促進する因子として重要であり、真核生物と古細菌では PCNA と RFC がそれぞれクランプおよびクランプローダーとして機能する。RFC は AAA+ファミリーに属し、ATP 依存的に鋳型 DNA 上プライマー3'末端付近に PCNA を装てんする。我々は、複雑な真核生物の DNA 複製システムを理解する上で有用なモデルになると考えられる古細菌のタンパク質群を用い、クランプ装てん機構を始めとする DNA 複製過程の原子レベルでの解明を目標とし、本研究では蛋白質結晶学研究室との共同研究のもと、RFC および RFC-PCNA-DNA3 者複合体の高分解能結晶構造決定を目指している。</p> <p>(1)RFC 結晶の回折能は本質的に弱く、高分解能構造決定には数多くの X 線回折実験、すなわち多量の単結晶が必要とされる。そこで、精製用アフィニティタグを用いたアフィニティクロマトグラフィーを改良することにより、迅速に結晶化に適した純度に RFC を精製するプロトコルの開発を行った。得られた精製標品を用いてアポ型、ADP 結合型、および ATP アナログ結合型の結晶化を行い、得られた結晶を用いて X 線回折実験を行った。アポ型および ADP 結合型はほぼ同じ回折能を示したが、これまでと結晶と変わらず中分解能であった。一方、ATP アナログ結合型結晶の回折能は大きく低下していた。</p> <p>(2) DNA 複製初期過程にて、MCM ヘリカーゼ 6 量体は RFC と同じく AAA+ファミリーに属するが、RFC とは異なり、鋳型 DNA を解きほぐす機能を持つ。MCM は Cdc45 (古細菌では GAN) と GINS の 2 個のタンパク質により活性化され、CMG3 者複合体として機能する。そこで古細菌由来タンパク質を用い、機能的に重要な結合を持つ GAN-GINS 部分複合体の結晶構造解析を行った。GAN は真正細菌にて DNA 修復に重要な RecJ のホモログと推定されていたが、結晶構造から、GAN は MCM 活性化因子としての機能に重要なドメインを Cdc45 と、また DNA 修復に重要なエキソヌクレアーゼ活性ドメインを RecJ と共有し、DNA 複製と修復の双方で機能する多機能分子であることが明らかとなった。</p>			

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：平成 29 年 5 月 19 日 (火) ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp