

(様式 1-2)

提出日：2021 年 5 月 2 日

2020 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		栗栖源嗣 蛋白質結晶学研究室・教授	
<p>今年度は、特に植物 PCNA-FEN1 PIP-box ペプチド複合体の高分解能結晶構造決定に向けた研究を優先的に実施した。現在の植物（主にシロイヌナズナ <i>Arabidopsis thaliana</i>）DNA 複製研究の主要課題は、フラップエンドヌクレアーゼ(FEN1)のリン酸化および PCNA 依存的なフラップ DNA 切断活性調節機構の構造機能解析と位置付けている。典型的なタンパク質のリン酸化では、比較的明確な活性制御（活性化あるいは活性抑制）が観察されるが、シロイヌナズナ FEN1 (<i>AtFEN1</i>)では、特定のサイクリン依存プロテインキナーゼ(Cdk)によるリン酸化部位は同定したが、そのリン酸化の機能的意義は未だ明確ではない。生化学解析を進める一方で、PCNA-リン酸化 FEN1 PIP-Box ペプチド複合体の高分解能結晶構造決定を目指した。</p> <p>シロイヌナズナは 2 種類の PCNA (<i>AtPCNA1</i> および <i>AtPCNA2</i>) を持ち、組換えタンパク質の発現、精製、結晶化プロトコールは基本的に確立している (Strzalka et al., <i>Protein Sci</i> 2009, Kowalska et al., <i>Acta Biochim Pol</i> 2020)。2 種類の PCNA 単独の結晶構造の決定（未発表データ）に続き、今年度は PCNA と FEN1 PIP-Box ペプチド、およびリン酸化 FEN1 PIP-Box ペプチドとの複合体の結晶化を目指した。PCNA と非リン酸化 FEN1 PIP-Box ペプチド複合体の結晶化には成功したが、X 線回折データ収集には至っていない。また、PCNA とリン酸化 FEN1 PIP-Box ペプチド複合体の結晶化には成功しなかった。</p> <p>今後の展望として、結晶を得られた複合体については結晶化の再現性を確認し、蛋白研ビームライン BL44XU を活用して X 線回折データを収集し、高分解能構造を決定したい。リン酸化ペプチド複合体の結晶化においては、リン酸化部位が PIP-Box とは異なる部位であったため、非リン酸化ペプチドと同じ条件で結晶が得られるものと想定していたが、同じ条件では結晶を得られなかった。次年度は広範な結晶化条件検索を行い、目的複合体の結晶を得るための実験を行う。また、立体構造未解明の <i>AtFEN1</i> 結晶構造解析を目指し、結晶化に向けた実験にも着手したい。</p>			