

提出日：平成 28 年 5 月 2 日

平成 27 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	生体超分子の精密構造解析		
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"/>	国際共同研究課題	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 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 教授 (蛋白質結晶学研究室)		
<p>ゲノムDNAの複製において、クランプとクランプローダーはDNAポリメラーゼの機能を促進する因子として重要な役割を果たしており、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の原子レベルでの解明を目標としている。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を必要とする。そこで、精製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目指した。RFC のカラムへの結合・カラム洗浄・カラムからの溶出条件を種々検討することにより、SDS-PAGE 上、従来法と変わらない純度の RFC を調製することに成功した。また、その精製標品を用いて結晶化を行い、以前の標品とほぼ同じ外見の単結晶を得ることができた。X 線回折実験を行ったところ、回折能は以前の結晶と変わらず中分解能であった。このアフィニティクロマトグラフィーと他のクロマトグラフィーを組み合わせることによりさらに高純度の精製標品の取得、または RFC 結晶を大量に調製し、結晶化の過程あるいは成長後の高品質化を目指した広範な実験が必要と考えられる。</p> <p>(2)RFC-PCNA-DNA 3 者複合体の結晶構造解析における初期構造決定ならびに原子モデル構築のプロセスで威力を発揮すると期待されるセレノメチオニン(Se-Met)化 PCNA について、高分解能で立体構造を決定した。その結果、Se-Met PCNA は野生型 PCNA と細部に渡り極めてよく似た構造であることが分かった。</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 28 年 5 月 20 日（金） ※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