

提出日：平成 30 年 5 月 2 日

平成 29 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 の複製は全ての生物にとって必須のイベントであり、その基本的な仕組みは、全ての生物界にわたり保存されている。これまで我々は、複雑な真核生物の DNA 複製機構を理解する上で重要なモデルとなる超好熱古細菌 <i>Pyrococcus furiosus</i> (Pfu) や <i>Thermococcus kodakarensis</i> (Tko) のタンパク質群を用い、DNA トランスアクションの原子レベルでの解明を目標に研究を行っており、特に近年は蛋白質結晶学研究室との共同研究のもと、MCM ヘリカーゼをコアとする CMG ヘリカーゼホロ酵素、およびスライディングクランプ PCNA の DNA 鎖への装てんに必須のクランプローダー RFC の構造機能相関に焦点を当て、高分解能結晶構造決定を目指している。</p> <p>(1) CMG 関連複合体：CMG には幾つかの複製開始点着火因子が機能的相互作用を行う。それらのうちの 하나가 MCM では無く、GAN-GINS 複合体に安定に結合することが分かり、その 3 者複合体の結晶を得た。そこで、この 3 者複合体の構造決定を目指して実験を行った。3 つのタンパク質因子を大腸菌組換えタンパク質大量発現系にて共発現し、精製後、単結晶を調製した。得られた結晶について X 線回折実験を行い、最大 3.2 Å 分解能で X 線回折データを数セット収集した。本結晶の非対称単位にはおそらく 2 個の 3 者複合体が存在していると予想された。現在、関連する既知タンパク質構造をプローブとした分子置換法による構造決定を試みると共に、セレノメチオニン(SeMet)誘導体を用いた SAD による構造決定が必須となる可能性に備え、SeMet 置換タンパク質の調製と結晶化を試みている。</p> <p>(2) RFC 複合体：以前に電子顕微鏡単粒子解析によって決定した RFC-PCNA-DNA 複合体構造からクランプ装てん機構に関する幾つかの重要な知見を得たが、分解能の限界のため、未決も問題も存在する。3 者複合体の高分解能結晶構造決定を将来の目標に据え、まずは RFC の高分解能結晶構造決定を目指している。本年度はタンパク質精製法について見直すため、高純度精製標品取得可能と期待される幾つかの精製用アフィニティタグの導入を試みた。発現プラスミドの構築に続き、初期的な複合体発現実験を行い、タグ無し、および 2 種のアフィニティタグ融合型で大量発現が期待される結果を得た。</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 30 年 5 月 18 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