

研究区分	教員特別研究推進 独創・先進的研究
------	-------------------

研究テーマ	複製が完了したDNAからPCNAを除去する分子メカニズムの解明に向けた基盤整備				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博
	研究分担者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	原 幸大
		所属・職名	薬学部・助教	氏名	菱木 麻美
	発表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博

講演題目	PCNA アンローダーATAD5 の調製法の検討				
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>【背景】 PCNAは全ての真核生物で保存されたタンパク質で、孔の開いたドーナツ状の構造をとる。PCNAは中央の孔に二本鎖DNAを結合するとともに、DNA複製・修復・細胞周期に関わる様々なタンパク質と相互作用し、それらがDNA上で働くための足場として機能する。PCNAが二本鎖DNAに適切に結合するためには、ローダーと呼ばれるタンパク質が必要である。また、アンローダーと呼ばれるタンパク質によって、ATP依存的にDNAクランプは二本鎖DNAから除去される。PCNAのローディング機構に関して、これまではローダーであるRFC (RFC1-RFC2-RFC3-RFC4-RFC5複合体) の構造と機能の研究が盛んに行われてきた。近年、アンローダーの発見によってPCNAのアンローディング機構とその生物学的重要性が注目されている (Kubota <i>et al.</i>, <i>Mol Cell</i> 2013; Kubota <i>et al.</i>, <i>Cell Rep</i> 2015; Johnson <i>et al.</i>, <i>Cell Rep</i> 2016; Kang <i>et al.</i> <i>Nature Commun</i> 2019)。PCNAがDNA複製後にDNA上に蓄積するとゲノムが不安定化することから、複製を正常に終了するためにはDNAからPCNAの除去が必要である (Johnson <i>et al.</i>, <i>Cell Rep</i> 2016)。しかし、これまでにアンローダーの構造生物学的研究は報告が無く、PCNAがどのような仕組みで複製が完了した二本鎖DNAから除去されるかは不明である。</p> <p>【研究の目的】 ヒトにおいて、ATAD5-RLC (ATAD5-RFC2-RFC3-RFC4-RFC5複合体) がPCNAのアンローダーである。本研究ではヒトATAD5-RLCを対象としており、その立体構造解析、PCNAやDNAとの複合体の立体構造解析によって、PCNAのアンローディング機構を構造生物学的に解明することを目指している。令和3年度は、X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析による立体構造解析に適したヒトATAD5の組換えタンパク質の調製を検討した。</p> <p>【成果】 ATAD5のATPaseドメインがPCNAとの結合に関与することが報告されている (Kang <i>et al.</i> <i>Nature Commun</i> 2019)。そこで、ATAD5のATPaseドメインに着目し、大腸菌を用いた組換えタンパク質の調製を試みた。アフィニティタグとしてHisタグあるいはGSTタグを付加させる発現ベクターを構築し、組換えタンパク質の発現を検討した。その結果、IPTGによる誘導発現は良好であったが、目的とする組換えタンパク質は不溶性タンパク質として発現していた。そこで、培養温度や誘導条件、フォールディングを助けるシャペロンとの共発現を検討したが、不溶性は改善されなかった。</p> <p>【今後の展望】 ATAD5のATPaseドメイン単独では可溶性タンパク質として発現しなかったため、ATAD5とRFC2-RFC3-RFC4-RFC5との共発現を検討していく。</p>				