

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

研究テーマ	リーディング鎖の DNA 合成に必要なクランプローダーの構造研究に向けたタンパク質生産				
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・講師	氏名	菱木 麻美
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博

講演題目	CTF18-1-8-RLC の構造研究に向けたタンパク質生産
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>【背景】 DNA 複製ではリーディング鎖の連続的 DNA 合成とラギング鎖の断片的 DNA 合成が連動して行われる。リーディング鎖では PCNA クランプを足場として DNA ポリメラーゼ ϵ が DNA の連続合成を行う。そのためには、リーディング鎖特異的クランプローダーである CTF18-1-8-RLC が PCNA クランプをリーディング鎖に結合（ローディング）させることが必要である。ヒトは 4 種のクランプローダー（RFC、CTF18-1-8-RLC、ATAD5-RLC、RAD17-RLC）を持つ。このうち CTF18-1-8-RLC は、①リーディング鎖の連続合成に必要である、②PCNA クランプのローディング活性とアンローディング（DNA から取り除く）活性を持つ、③脊椎動物の染色体構造の形成に関与する、④ヘテロ七量体構造（他はヘテロ五量体）をとるなど、他の 3 つのクランプローダーとは異なる特徴を持つ。しかし、CTF18-1-8-RLC の構造生物学的知見は、酵母ホモログの一部のサブユニット（Dcc1-Ctf8 複合体）に限定されている</p> <p>【目的】本研究では、ヒト CTF18-1-8-RLC の立体構造とリーディング鎖合成に必須な機能を構造生物学的に解明することを目指し、クライオ電子顕微鏡（クライオ EM）による単粒子構造解析（SPA）及び X 線結晶構造解析（PX）に向け、大腸菌を用いた組換えタンパク質の生産と性状評価を行うことを目的とした。【実験・結果】CTF18-1-8-RLC は、CTF18-DCC1-CTF8-RFC2-RFC5-RFC4-RFC3 複合体である。このうち、RLC 部分（RFC2-RFC5-RFC4-RFC3）は他のクランプローダーと共通である。本研究では、まず RLC の共発現ベクターに CTF18 を挿入し CTF18-RLC の共発現ベクターを作製した。ヒト CTF18 は全長 975 アミノ酸残基のタンパク質である。CTF18 全長、N 末端側のディスオーダー領域を除いた 276-975、さらに C 末端のディスオーダー領域も除いた 276-869 をそれぞれ RLC の共発現ベクターに組み込んだ。RLC の共発現ベクターは、RFC2 サブユニットのディスオーダー領域を除いた RLC2s も検討した。また、アフィニティー精製のための His タグは CTF18 の N 末端あるいは C 末端に付加した。作製した CTF18-RLC の共発現ベクターで大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し、発現条件を検討した。その結果、CTF18(276-869)の C 末端に His タグを付加した場合、CTF18-RLC が可溶性タンパク質として発現した。CTF18-RLC の精製を試みたところ、大腸菌破砕液の遠心上清をアフィニティービーズに吸着させた際に CTF18(276-869)が凝集し、そのためビーズから溶出させることができなかった。今後、培養条件や精製条件の検討が必要である。一方、DCC1-CTF8 複合体の共発現ベクターを作製し、発現条件を検討した結果、GST タグを付加した場合、発現量及び可溶性、グルタチオンビーズへの吸着が良好であった。今後、精製条件を検討していく予定である。</p>