

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 2 4 年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 若手研究(B) 4. 補助事業期間 平成 2 3 年度 ~ 平成 2 5 年度

5. 課題番号

2	3	7	7	0	1	1	8
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題 RecQヘリカーゼによるテロメア維持機構の構造研究

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
4 0 3 4 6 3 0 9	キタノ ケン 北野 健	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

ウェルナー症候群とブルーム症候群は、常染色体劣性のまれな遺伝病である。発症の原因はそれぞれ、WRN ヘリカーゼ (Werner syndrome protein) と BLM ヘリカーゼ (Bloom syndrome protein) に変異が起こり、機能欠損してしまうことが原因である。WRN と BLM は、DNA 巻き戻しのさいモーターとして働く ATPase ドメインに加えて、C 末に特徴的に保存された RQC (RecQ C-terminal) ドメイン と HRDC ドメイン (helicase-and-ribonuclease D-C-terminal) を有している。

今年度は、これらドメインを含む WRN ヘリカーゼと BLM ヘリカーゼの新たなタンパク質発現コンストラクトの作成を、重点的に進めた。タンパク質の N 末側には、精製を効率的に進めるためのアフィニティータグ glutathione-S-transferase (GST) を融合させた。

タンパク質発現条件と精製条件を詳細に検討した結果、いくつかのタンパク質試料を大腸菌によって大量発現させ、高純度に精製することができた。精製のためのクロマトグラフィーには、GST 融合タンパク質用アフィニティーカラム、イオン交換カラム、およびゲルろ過カラムを利用した。タンパク質や DNA 試料の濃度調製には、分光光度計による吸光度測定の方法を用いた。これらの研究成果の一部は、アメリカで開催された国際学会で発表した。

10. キーワード

- | | | | |
|--------------|-------------|-----------|---------------|
| (1) タンパク質 | (2) DNA | (3) ヘリカーゼ | (4) RecQファミリー |
| (5) ウェルナー症候群 | (6) ブルーム症候群 | (7) 構造生物学 | (8) 生化学 |

11. 現在までの達成度

(区分)(3) やや遅れている。

(理由)

計画していた作業のうち、目的タンパク質の大腸菌を用いた大量発現、クロマトグラフィーによる高純度精製、そしてアニーリングによる結晶化用 DNA 試料の調製は、おおむね順調に進んでいる。
ただし、WRN ヘリカーゼや BLM ヘリカーゼ と DNA の複合体結晶は得られていない。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

長さや配列を変化させた DNA 試料の調製と、新しい発現コンストラクトを用いたタンパク質試料の精製をおこなって、引き続き、結晶化条件の探索を進める。
結晶が得られれば、兵庫県播磨市の大型放射光施設スプリング-8、または茨城県つくば市の高エネルギー加速器研究機構 (KEK) に出張して、高輝度 X 線を利用した X 線回折データ測定を行う予定である。

(次年度の研究費の使用計画)

未使用額が生じた要因は、結晶化実験の進捗状況に合わせて、予算執行計画を変更したことに伴うものである。
今後、未使用額の研究費は、結晶化用および相互作用分析用の DNA オリゴの受託合成費、タンパク質の変異体作成・精製・結晶化実験・X 線結晶解析に必要な消耗品の購入、スプリング-8 または高エネルギー加速器研究機構 (KEK) への国内旅費、学会で研究成果を発表するための国内および海外旅費、などに使用する予定である。

13.研究発表(平成24年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(0)件 うち査読付論文 計(0)件

著者名		論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					

〔学会発表〕計(2)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題		
Ken Kitano, Sun-Yong Kim, Toshio Hakoshima		Crystallographic Studies of Werner Syndrome DNA Helicase.		
学会等名	発表年月日	発表場所		
Meeting of the American Crystallographic Association (ACA2012)	2012年07月29日	Boston, USA.		

発表者名		発表標題		
寺脇慎一, 北野 健, 青山美樹, 箱嶋敏雄		ERM 蛋白質による膜貫通型プロテアーゼ MT1-MMP 認識の構造的基盤		
学会等名	発表年月日	発表場所		
平成24年度 日本生化学会 関東支部例会	2012年06月23日	群馬大学		

(図書) 計(0)件

著者名	出版社			
書名			発行年	総ページ数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

--