

平成 17 年度科学研究費補助金実績報告書 (研究実績報告書)

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 特別研究員奨励費 4. 研究期間 平成 16 年度 ~ 平成 17 年度
5. 課題番号 1 6 ・ 5 0 1 0

6. 研究課題名 複合体結晶の構造決定に基づく構造特異的ヌクレアーゼ FEN1 の機能・制御機構の研究

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
	フガナ サクライ, シゲル 櫻井, 滋	情報科学研究科	特別研究員(PD)

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名
	フガナ		

9. 研究実績の概要(国立情報学研究所でデータベース化するため、600字~800字で記入。図、グラフ等は記載しないこと。)

DNA の複製系において、岡崎フラグメントの RNA プライマーは最終的に副産物として鋳型鎖から引き剥がされ、FEN1 によって構造特異的に切断除去される。また、FEN1 の酵素活性は、DNA スライディングクランプである PCNA と相互作用することによって、大幅に促進される。本研究では、既にヒト由来 FEN1 と PCNA との複合体の結晶構造を決定したが、この構造には基質となる DNA が含まれていないため、FEN1 による DNA の認識機構や触媒機構を解明するまでには至らなかった。本研究では、これらの機構を解明することを目的として、本年度は、基質となる DNA を含めた FEN1-DNA 複合体および FEN1-PCNA-DNA 複合体の結晶化条件の検索に努めた。

一般的な経験則として、DNA-タンパク質複合体は、特定の塩基配列の DNA を用いて、PEG を沈殿剤としたときに結晶化に成功することが多い。本研究では、DNA との複合体結晶を作製するために、新たに下記の 3 つの試料を準備して結晶化条件を検索した。第 1 に、触媒活性を失活する活性中心変異体や無駄な領域を省いた 9 種類の FEN1 のコンストラクトを作製した。第 2 に、既に決定した FEN1-PCNA 複合体の結晶構造を基にして、DNA を含めた立体構造モデルを作成した。そのモデルから、結晶化に適用できる DNA の長さを予測し、その予想に基づいて 16 種類の結晶化用の DNA を調整した。第 3 に、市販されている結晶化スクリーニングキットから、PEG を沈殿剤とする条件のみを抜粋して結晶化条件の検索に用いた。

新たに調整した上記の FEN1 と DNA の組み合わせを変えて結晶化条件を検索した結果、特定の DNA と FEN1 のコンストラクトを組み合わせた FEN1-DNA 複合体を用いたときのみ、幅広い条件で結晶が得られた。また、これらの結晶を用いて、放射光施設 SPring-8 で分解能 5Å の X 線回折データの収集することに成功した。今後、FEN1-DNA 複合体の最適な結晶化条件を検索して、高分解能の X 線回折データを収集して、既に決定したヒト FEN1 の立体構造をモデル分子とした分子置換法によって、複合体の結晶構造を決定する予定である。

成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した調査(A4 判縦長横書 1 枚)を添付すること。

10. キーワード

- (1) 構造生物 (2) 結晶構造 (3) DNA 複製
 (4) (5) (6)
 (7) (8) (裏面に続く)

11. 研究発表(平成17年度の研究成果)
〔雑誌論文〕 計()件

著者名	論文標題		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
		□□□	

著者名	論文標題		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
		□□□	

著者名	論文標題		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
		□□□	

著者名	論文標題		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
		□□□	

著者名	論文標題		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
		□□□	

著者名	論文標題		
雑誌名	巻・号	発行年	ページ
		□□□	

〔図書〕 計()件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	
	□□□		

12. 研究成果による工業所有権の出願・取得状況
計()件

工業所有権の名称	発明者	権利者	工業所有権の種類、番号	出願年月日	取得年月日