

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30年度）

			機関番号	1 4 6 0 3
所属研究機関名称 奈良先端科学技術大学院大学				
研究 代表者	部局	先端科学技術研究科		
	職	准教授		
	氏名	深井 祥子（藤間祥子）		

1．研究種目名

基盤研究(C)(一般)

2．課題番号

18K06077

3．研究課題名

GCN5のPCAF-HDが担う肝糖新生亢進機構の立体構造からの解明

4．補助事業期間

平成30年度～令和2年度

5．研究実績の概要

本研究では、GCN5のE3活性および糖新生亢進との関係の解明を目的としている。初年度である平成30年度は、6つの研究計画のうち、E2酵素の選別、Znフィンガー構造の活性における役割の解明、の2つの実験を行った。それぞれの結果の概要を記す。

< E2酵素の選別> 実験計画通り、市販のE2酵素10種類を用い、GCN5の自己ユビキチン化に用いられるE2酵素を選別した。結果、UbcH3, UbcH5a, UbcH5b, UbcH5cにおいて明確なポリユビキチン化反応を確認した。UbcH5a, 5b, 5cはアミノ酸配列相溶性が高く、同様のポリユビキチン化反応パターンを示したため、同様の機構で働くと判断し、次からの実験からは、UbcH5bを用いることにした。次に、UbcH3遺伝子を理化学研究所より購入し、UbcH5bと同様に大腸菌発現系を用いて高純度精製標品を調製した。独自に調製した高純度の2種類のE2酵素を用いて、ポリユビキチン化反応を評価した。結果、UbcH5bがより効率高くGCN5の自己ユビキチン化反応を進めることを見出した。

< Znフィンガー構造の活性における役割の解明> 結晶構造からGCN5は特徴的な2核配位のZnフィンガーモチーフを持つことを明らかにしていた。Znに配位する7つの配位残基の前半と後半をアラニンに置換した2種類のアラニン変異体を作成した。同時に、立体構造から同定したZnドメインを欠損させた欠損変異体も作成した。これらをそれぞれ大腸菌で発現させ、自己ユビキチン化活性を測定した。結果、Zn配位はGCN5の安定化に寄与すること、Znドメインを欠損させることによりユビキチン化反応がほぼ消失することを見出した。

以上の結果と先行研究で行った結晶構造解析の結果を合わせて、論文を執筆した。現在、投稿準備中である。

6．キーワード

X線結晶構造解析 ポリユビキチン化反応

7．現在までの進捗状況

区分	(2) おおむね順調に進展している。
理由	計画研究で掲げた6つの計画のうち1/3に当たる2つを終えることができた。 E2酵素の選別、およびZnフィンガードメインの変異体実験では、E2酵素の持つポリユビキチン化反応に由来するバックグラウンドの高さから最適な活性測定系の確立に時間を要したが、最終的には測定系の確立に成功した。 上記実験が終了したのちに、研究代表者の所属変更があり後半は実験が思うように行えなかったが、論文執筆を行うなど研究活動は順調に前進した。

2 版

8．今後の研究の推進方策

現所属において、研究を推進する環境は整っている。新たに大学院生に研究協力者として参画してもらう計画であり、研究をより精力的に進めてゆく。
本年度は残る計画のうち、活性ドメイン、活性残基の同定および Ub 転移機構の立体構造からの解明を中心に行う。また、PKA によるリン酸化と Ub 転移機構の評価実験も開始する。

9．次年度使用が生じた理由と使用計画

次年度使用額が無いため、記入しない。

10．研究発表（平成30年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1．著者名 Shimizu Hikaru, Toma-Fukai Sachiko, Kontani Kenji, Katada Toshiaki, Shimizu Toshiyuki	4．巻 115
2．論文標題 GEF mechanism revealed by the structure of SmgGDS-558 and farnesylated RhoA complex and its implication for a chaperone mechanism	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6．最初と最後の頁 9563 ~ 9568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1804740115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1．発表者名 Ryota HIBI, Sachiko TOMA-FUKAI, Mashito SAKAI, Takao NAGANUMA, Michihiro MATSUMOTO, Toshiyuki SHIMIZU
2．発表標題 Crystal structure of PCAF - homology domain of GCN5 reveals its unique structure as ubiquitin E3 ligase
3．学会等名 AsCA 2018（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 藤間祥子
2．発表標題 細胞内創薬標的蛋白質の PX-BioSAXSを用いた構造機能相関解析
3．学会等名 PF研究会 多様な物質・生命科学研究に広がる小角散乱（他）分野の小角散乱を学ぼう！（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 日比亮太，藤間祥子，酒井真志人，長沼孝雄，松本道宏，清水敏之
2．発表標題 新規ユビキチンE3リガーゼドメインmGCN5 PCAF-HDの結晶構造解析
3．学会等名 日本結晶学会年会
4．発表年 2018年

1．発表者名 藤間祥子
2．発表標題 リード化合物創成を目指した創薬標的蛋白質の構造機能相関解析
3．学会等名 平成30年度第2回構造生物学研究会（招待講演）
4．発表年 2018年

1．発表者名 日比亮太，藤間祥子，酒井真志人，長沼孝雄，松本道宏，清水敏之
2．発表標題 新規E3フォールド酵素PCAF-HDの構造科学研究
3．学会等名 日本薬学会 第139年会（千葉）
4．発表年 2018年

2 版

1．発表者名 Hikaru SHIMIZU, Sachiko TOMA-FUKAI, Nobutaka SHIMIZU, Shinya SAIJO, Toshiaki KATADA, and Toshiyuki SHIMIZU
2．発表標題 Structural basis of RhoA recognition by unique guanine nucleotide exchange factor SmgGDS
3．学会等名 AsCA 2018 (国際学会)
4．発表年 2018年

1．発表者名 清水光, 藤間祥子, 紺谷圈二, 堅田利明, 清水敏之
2．発表標題 特異なグアニンヌクレオチド交換因子SmgGDSによるRhoA認識機構の構造基盤
3．学会等名 PPF2018
4．発表年 2018年

〔図書〕 計0件

1 1．研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件／うち取得0件）

1 2．科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

-

1 4．備考

-