

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）（令和2年度）

			機関番号	14603
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3年度

5. 研究実績の概要

本研究では、2型糖尿病治療薬開発に向け、肝糖新生酵素遺伝子の発現機構を構造生物学的アプローチからの解明を目的とする。特に、GCN5蛋白質のN末端ドメインが持つユビキチンリガーゼ(E3)活性に着目し、新規E3酵素の活性発揮機構の解明を第一の目的とし研究を進めている。

R2年度は、R1年度に引き続き、試験管内でのユビキチン化酵素活性を評価するための実験系の確立を試みた。これは、研究計画の②『活性ドメイン、活性残基の同定』、⑥『E2酵素、UBの認識UB転移機構の立体構造からの解明』に該当する。R1年度では、市販のE1酵素、ユビキチンを用いて、GCN5全長およびGCN5のPCAF-HDによるE2酵素からユビキチンを転移する能力が有るかを評価したが、弱い活性しか確認出来ず、また再現性においても課題があった。検討した結果、使用したユビキチンの購入ロットにより活性に差が出る事が明らかとなり、E1酵素、ユビキチンを自作し、既報に従い高純度精製し活性測定を行うことにした。結果、安定に酵素活性が確認できるようになった。また、GST融合PCAF-HDを用いて、PCAF-HDは付加タグGSTに効率良くユビキチン転移反応を触媒することも明らかになり、研究代表者らが決定したPCAF-HDが新規フォールドを持つユビキチンE3酵素であることが明確になった。構造を基盤とし、PCAF-HDの特徴的なZnフィンガー領域を欠損させ活性を測定した結果、Znフィンガー領域が活性に関与することが明らかになった。このZnフィンガー構造は典型的なユビキチンE3酵素が持つRINGドメイン構造とは明確に構造が異なる。このZnフィンガー領域単独では、E3酵素活性が確認されなかったが、精製標品に分解も見られたため、再度調製方法を検討し、丁寧に検証していく必要がある。以上の結果をまとめて、論文を発表した。

6. キーワード

構造生物学 結晶構造解析 ユビキチンリガーゼ

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	今年度の課題であったin vitroでの活性測定系の確立に成功し、複合体構造研究に向けた実験に着手する準備が整った、それぞれの高純度試料調製方法の確立は完了したので、結晶化に実験研究を進める。

2 版

8. 今後の研究の推進方策

初年度の実験は順調に進んだが次年度（R1年度）の実験計画が当初の予定より進捗しなかった。3年目のR2年度にR1年度の課題を克服できたので、全計画の1/2程度が達成できたことになる。補助事業期間の延長をしたので、R2年度に構築したin vitroでの活性評価系を用いて、GCN5のE3活性を発揮するために必要な領域の同定を行うのと並行して結晶構造解析に向けた構造のスクリーニング実験を積極的に行う。

9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

COVID-19感染拡大による登校制限で実験が計画通りに進まなかったこと、全ての参加学会がオンラインとなり学会参加費が大幅に削減できたため未使用額が生じた。最後まで達成できていない計画研究を進めるための経費として使用する。具体的には、追加実験の実施や学会参加、論文投稿準備に利用する。

10. 研究発表（令和2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 Toma-Fukai Sachiko, Hibi Ryota, Naganuma Takao, Sakai Mashito, Saijo Shinya, Shimizu Nobutaka, Matsumoto Michihiro, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 295
2. 論文標題 Crystal structure of GCN5 PCAF N-terminal domain reveals atypical ubiquitin ligase structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14630～14639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013431	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

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 Crystal structure of GCN5 PCAF-homology domain reveals atypical ubiquitin ligase structure
3. 学会等名 第93 回日本生化学会大会（2020年）
4. 発表年 2020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

—