

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	神経膠腫で高発現し腫瘍の増大を抑制するタンパク質の構造解析に向けた試料調製				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	菱木 麻美
	研究分担者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	菱木 麻美

講演題目	環状 RNA から合成される SHPRH-146aa の可溶化条件の探索と試料調製
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>DNA 複製の異常を回避する戦略の一つにテンプレートスイッチがある。テンプレートスイッチは、損傷により DNA の複製が停止した際に、複製フォークを巻き戻し、損傷のない相補鎖から合成された新生鎖を鋳型にして DNA 合成を行う方法である。SHPRH は酵母 RAD5 のヒトホモログであり、DNA 複製の足場タンパク質である PCNA をポリユビキチン化し、テンプレートスイッチを促進する。SHPRH は全長 1683 アミノ酸残基からなるタンパク質であるが、<i>circ-SHPRH</i> と呼ばれる環状 RNA によってコードされる 146 アミノ酸残基のタンパク質 (SHPRH-146aa) も近年報告されている。環状 RNA はノンコーディング RNA に分類され、miRNA スポンジとしての機能が報告されている。しかし、<i>circ-SHPRH</i> から合成される SHPRH-146aa の過剰発現が、神経膠腫の形成や神経膠芽腫の増殖を抑制することが報告され、miRNA スポンジではない、別の機能があることが予想される。実際、miRNA を吸着する環状 RNA は限られていることから、この機能は一般的ではないともいえる。SHPRH-146aa は全長 SHPRH の C 末端領域とほとんど同じ配列を持ち、プロテアソームによる分解が促進されるポリユビキチン化修飾部位を含む。SHPRH-146aa は、自身がポリユビキチン化修飾を受けることで、全長 SHPRH のポリユビキチン化を阻害し、結果として全長 SHPRH を分解経路から保護している可能性が考えられることから、SHPRH-146aa は新たな創薬ターゲットになり得る。がんに対する効果的な治療法を開発するためには、腫瘍の形成や抑制のメカニズムを理解することが不可欠であることから、本研究では、SHPRH-146aa の X 線結晶構造解析を目指し、試料調製法を検討した。</p> <p>先行研究より、大腸菌 BL21 (DE3) を用いて発現させた SHPRH-146aa はほとんどが不溶性であったが、発現方法、培養温度、宿主大腸菌、可溶性タグを再検討し、可溶性を改善させた。特に、シャペロンタンパク質を共発現させる宿主大腸菌を用いたときに可溶性が向上した。SHPRH-146aa を、シャペロンタンパク質との複合体で調製し、得られたタンパク質を用いて結晶化スクリーニングを行ったところ粗結晶を得ることに成功した。今後は、この粗結晶が SHPRH-146aa を含む結晶であるかを調べ、X 線結晶構造解析に適した結晶化条件の探索を進めていく予定である。</p>