

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

研究テーマ	環状 RNA から合成される神経膠腫抑制蛋白質の X 線結晶構造解析				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・助教	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・助教	氏名	菱木 麻美

講演題目	環状 RNA がコードする SHPRH-146aa の試料調製
------	---------------------------------

研究の目的、成果及び今後の展望

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、最近になって、*circ-SHPRH* 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) が報告された。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知られている。しかし、これまでに機能が証明されている環状 RNA はごくわずかであり、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考えられる。実際、*circ-SHPRH* から合成される SHPRH-146aa の過剰発現は、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ており、SHPRH-146aa は新たな創薬ターゲットになり得る。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ことから、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、結果的に全長 SHPRH を分解経路から保護していると考えられる。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。

SHPRH-146aa の発現には、大腸菌 BL21 (DE3) を用いた。発現量は十分だったが、ほとんどが不溶性だったため、発現方法、培養温度、宿主大腸菌、可溶化タグを再検討した。その結果、シャペロンタンパク質を共発現する宿主大腸菌と、複数の可溶化タグを用いた場合に、SHPRH-146aa の可溶化が改善した。現在は、目的タンパク質とシャペロンタンパク質との分離を目指し、使用するカラムの種類、バッファー組成などの精製条件を検討している。引き続き、結晶化に適した SHPRH-146aa を調製するため、精製条件の確立を目指す。