

研究区分	教員特別研究推進 独創・先進的研究
------	-------------------

研究テーマ	環状 RNA から合成される脳腫瘍抑制タンパク質の構造生物学的研究				
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 と PCNA の結晶学的研究
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>若年層におけるがんの内訳は、脳腫瘍の割合が中高年層と比較して高く、中でも小児では白血病に次いで2番目に多いことが知られている。悪性脳腫瘍の中で最も多い疾患は神経膠腫であり、2割以上を占める。遺伝情報を担う DNA は、外的または内的要因により絶えず損傷を受ける。DNA 損傷が修復されずに DNA 複製が進行すると、塩基の誤対合や複製阻害が起こり、発がんや老化を促進する原因となる。DNA 複製の異常を回避する戦略の一つがテンプレートスイッチであり、全長 1683 アミノ酸残基からなる SHPRH は、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。近年 <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) が発見され、SHPRH-146aa の過剰発現が、神経膠腫の形成、神経膠芽腫の増殖を抑制することが報告された。神経膠芽腫は、神経膠腫の中で最も悪性度が高く、有効な治療方法は確立されていない。SHPRH-146aa は PCNA との相互作用に重要な AlkB homolog 2 PCNA interacting motif (APIM) を持ち、PCNA との結合が神経膠腫の形成や神経膠芽腫の増殖抑制に重要である可能性が高い。本研究では、神経膠腫の形成や神経膠芽腫の増殖を抑制する SHPRH-146aa の構造基盤を解明することを目的に、SHPRH の APIM と PCNA の相互作用解析と X 線結晶構造解析を行なった。</p> <p>まず、SHPRH の APIM (以下、SHPRH_APIM) と PCNA との相互作用を確認するため、SHPRH の APIM を含む領域を GST 融合タンパク質として発現させ精製した (以下、GST-SHPRH_APIM)。また、APIM の共通配列を Ala に変異させた GST-SHPRH_APIM (MT) の発現系を作製し、同様に調製した。得られた GST-SHPRH_APIM、GST-SHPRH_APIM (MT) を用いて PCNA とプルダウンアッセイを行ったところ、PCNA は GST-SHPRH_APIM と結合したが、GST-SHPRH_APIM (MT) には結合しなかった。この結果から、PCNA が SHPRH の APIM と特異的に相互作用することを確認した。次に、APIM 領域を含む SHPRH のペプチド (SHPRH ペプチド) と PCNA の共結晶化を行なった。得られた結晶を用いてフォトンファクトリー-BL-17A (茨城県つくば市) で 2.69 Å 分解能の X 線回折強度データを収集した。既に報告されている PCNA の構造をサーチモデルに用い、分子置換法で構造解析した。構造解析の結果、PCNA と SHPRH ペプチドは 1:1 で結合していた。得られた結晶中では、近傍の SHPRH ペプチド同士が N 末端領域で相互作用していた。また、SHPRH ペプチドは、PCNA の相互作用ポケットの近傍に結合していたが、特異的な相互作用はほとんど見られなかった。このことから、今回得られた結晶構造は、SHPRH が PCNA との機能的な複合体を形成する前段階の構造であると考えられ、異なる結晶化条件を探索する必要がある。</p>