

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

研 究 テーマ	非小細胞肺がんのオートファジー調節機構に関する構造生物学的解明				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	菱木 麻美
	研究協力者	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
非小細胞肺がんのオートファジー調節機構に関する構造生物学的解明に向けた試料調製と結晶化
研究の目的、成果及び今後の展望 オートファジーは、酵母、植物、動物など全ての真核生物が持つ細胞内の浄化・リサイクルシステムであり、細胞内の変性タンパク質や細胞内に侵入した病原性細菌などを分解して浄化することに加え、飢餓状態の栄養源を確保する生命維持に欠かせない細胞機能である。オートファジーは、がんにおいて『諸刃の剣』と称され、がんに対して抑制性と促進性の二面性を持ち、どちらの作用を示すかは、がんの病期、種類、腫瘍微小環境に依存する。 非小細胞肺がん（non-small cell lung cancer; NSCLC）において、オートファゴソームの形成に関与する BECN1 は、RING ドメインを持つユビキチンリガーゼ TRAF6 により K63 型ポリユビキチン化修飾を受けてオートファジーを誘導し、腫瘍を抑制する。一方、TRAF6 と同様に RING ドメインを持つユビキチンリガーゼ TRIM59 は、①NFκB 経路の負の調節因子として働き、BECN1 の発現を抑制し、②TRAF6 を K48 型ポリユビキチン化修飾し、プロテアソームによる分解を誘導する可能性が示されている。TRIM59 は、①と②の 2 つの機構により、NSCLC でのオートファジーを負に制御し、腫瘍抑制効果を阻害すると考えられる。TRAF6 と TRIM59 の詳細な相互作用の解明は、肺がんの大半を占める NSCLC の新規抗がん治療薬開発に資すると考えられることから、本研究では TRAF6 と TRIM59 の X 線結晶構造解析を目指し、試料調製を行った。 全長 522 アミノ酸残基のタンパク質である TRAF6 は、大腸菌を用いて GST タグまたは His タグ融合タンパク質として発現させた。複数の条件で発現方法を検討し、全ての条件で TRAF6 の発現を確認することができた。しかし完全に不溶性であり、全長 TRAF6 を調製することはできなかった。今後は TRAF6 の発現領域を詳細に検討する必要がある。TRIM59 は、ユビキチン化活性を持つ RING ドメイン（TRIM59^{RING}）に 2 つの Zn フィンガーモチーフを持つ。TRIM59^{RING} を大腸菌を用いて発現させる際、LB 液体培地に Zn²⁺ を添加して培養したところ、Zn²⁺ を添加せずに培養したものと比較して、ゲル濾過カラム精製で異なるクロマトグラムを得た。目的タンパク質を含む画分をピークごとに分けて回収し、限外ろ過膜を用いて濃縮した。様々な条件を検討して得られた TRIM59^{RING} の結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリー BL-17A で X 線回折強度データを収集した。2.58 Å 分解能での構造解析に成功したが、2 箇所の Zn²⁺ 結合部位のうち、一方は Zn²⁺ の占有率が低く、十分に構造を精密化することはできなかった。今後は、2 箇所の Zn²⁺ 結合部位の両方について、Zn²⁺ の占有率の高い結晶を調製し、構造解析を進める予定である。