

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

研究テーマ	大腸がんを防ぐためにヌクレオソームを除去する SMARCAD1 の構造解析				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	原 幸大
	研究分担者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	橋本 博
		所属・職名	九州大学大学院理学研究院・教授	氏名	高橋 達郎
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	原 幸大

講演題目	SMARCAD1 好熱生糸状菌ホモログの調製方法の確立と結晶化条件の探索
------	--------------------------------------

研究の目的、成果及び今後の展望

本研究の目的は、ミスマッチ塩基対の周囲のヌクレオソームを除去することで修復酵素が DNA 領域にアクセスすることを可能にするクロマチンリモデラー SMARCAD1 の構造を X 線結晶構造解析により原子レベルで明らかにすることにある。ミスマッチ修復酵素が誤りを含む DNA を削り取るには、ヌクレオソームからほどかれた数百塩基以上のむき出しの DNA 領域が必要である。近年、九州大学大学院理学研究院の高橋教授（研究分担者）らにより、SMARCAD1 によるクロマチンリモデリング活性がミスマッチ修復に不可欠であることが明らかとなった (Terui *et al.*, *Genes Dev.*, 2018)。また、ミスマッチ修復酵素の異常は大腸がんの原因となるため、SMARCAD1 は新たながん治療戦略のための分子標的となる。しかし、SMARCAD1 の研究はこれまで生化学、細胞生物学的解析が中心に行われており、構造生物学的知見はほとんど得られていない。SMARCAD1 がヌクレオソームを除去する詳細な分子機構への理解は限定的である。SMARCAD1 の構造を明らかにすることは、ミスマッチ塩基対の周囲のヌクレオソームを除去する作用機序を原子レベルで解明するだけでなく、新たな抗がん剤や腫瘍マーカーの開発に向けた構造基盤となる。本研究は超高齢社会である日本において、主な死因である悪性新生物に着目しており、静岡県を目指す健康長寿社会の実現に向けた基盤研究である。

本年度は熱安定性に優れた SMARCAD1 の好熱性糸状菌ホモログ (CtSMARCAD1) に着目し、構造解析に向けた試料調製と結晶化条件の探索を進めた。CtSMARCAD1 の全長、及びクロマチンリモデリング活性を有するヘリカーゼドメインの遺伝子を組み込んだ pET 発現ベクターを用いて、N 末端領域に His タグを融合した CtSMARCAD1 の組換えタンパク質を大腸菌で過剰発現させた。集菌した後、菌体を超音波破碎し、目的の組換えタンパク質を含む上清（可溶性画分）を回収し、ヘパリンカラムとゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。CtSMARCAD1（全長）を精製したところ、分解産物が見られ、N 末端領域に不安定な領域が存在することが予測された。次に、不安定な N 末端領域を欠損させたヘリカーゼドメインを精製した結果、結晶化に適した溶液中で単分散の組換えタンパク質を調製することに成功した。得られた組換えタンパク質を用いて結晶化条件を探索したところ、硫酸アンモニウムを沈殿剤とした条件でいくつかの板状結晶を得ることに成功した。つくば放射光施設 Photon Factory にて X 線回折実験を行ったが、構造解析に適した良好な回折データを収集することができなかった。今後は構造解析に向けて、結晶のさらなる最適化、及び新規結晶化条件の再探索を継続して行う。