

提出日：2019年 5月 7日

平成 30 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	DNP-NMR 法によるスピンラベルタンパク質の構造解析		
研究代表者	氏名	荒田敏昭	
	所属機関名・部局名	大阪市立大学・大学院理学研究科	
	職名	特任教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	○	共同研究員	
		超高磁場NMR 共同利用研究課題	
		クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
		客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	藤原敏道		
<p>1) DNP-NMR 用分極化剤 (スピン標識化合物) を開発するため、藤原研究室が化学合成した新規化合物の ESR 測定を行い、その有用性を探索した。引き続き、新規化合物 Mn^{2+} 錯体-(有機ラジカル)n について、X バンド ESR を用いて Mn^{2+} 錯体や有機ラジカル、および Mn^{2+} 錯体と有機ラジカルの結合体について、g 値や超微細相互作用の測定を行った。さらに、シミュレーションによって交換相互作用 J 値を決定することに成功した。また、パワー飽和曲線から $T1$ を求めた。Mn^{2+} 錯体-(有機ラジカル)n 結合体は、$n=1\sim 4$ と増えるほど、交換相互作用 J が観測された。DNP 効率と $T1$ 値、J 値などの ESR パラメーターの関連などを調べる予定である。2) ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 がメチル化ヒストンと相互作用して転写が不活性化されることが知られている。今年度はリン酸化とアイソフォーム特異性の構造基盤を中心に、メチル化ヒストン、DNA との相互作用の解明を目指した。IDR である HR ドメインにスピンラベルしたところ、サブナノ秒域の側鎖の高速回転が観測され、DNA 添加によって HR 側鎖の僅かな運動束縛がおこった。この弱い束縛は、HR-DNA 結合が緩く相互に並進拡散運動すると推定された。CD の N 末端の疑似リン酸化変異によって、HR 側鎖の運動束縛が起こり、DNA 結合によるさらなる運動束縛は起こらなかった。リン酸化調節は、N 末端領域が HR 結合することによる HP1 ダイナミクスの変化と DNA 結合阻害を伴って起こると示唆された。HP1γ の HR を HP1α のそれと交換したキメラを作成したところ、CSD 運動性は低下して HP1α のそれに近づいたが、ヒストンメチル化ペプチド(H3K9me)、DNA 結合による CD 運動性低下は起こらなかった。HP1α への完全な変換はできなかった。したがって、アイソフォームの機能の違いは、HR だけではなく他のドメインとの協同作用と思われる。3) タンパク質多量体に常磁性イオン Mn^{2+} や Cu^{2+} を導入して、X バンド CW-ESR (蛋白研) ならびに Q バンドパルス ESR (大阪市大) を用いて、遺伝子工学と化学修飾を使わない native 試料における多数の電子スピン間距離を一回の測定で精密に計測する方法の開発を目指した。今年度は、宮田真人博士(大阪市大)の協力で予備実験を行い、MnATP のモータータンパク質(6 量体)への結合と加水分解に伴う CW-ESR スペクトルの変化を測定することに成功した。加水分解過程の中間体の ATP 結合状態の速度論、Q バンドパルス ESR (大阪市大) 測定をする予定である。</p>			

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：令和元年 5 月 17 日(金) ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp