

(様式 1-2)

提出日：2020 年 5 月 11 日

2019 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	

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。合成した(有機ラジカル)_n n=1~4 のうちバイラジカル n=2 のスペクトルについては、シミュレーションによって交換相互作用 *J* 値、双極子相互作用を決定し、ラジカル化合物構造特有(trans, cis, 分子長)の電子状態を解明することに成功した。

また、以前に行った研究室の DNP-NMR 測定についての論文作成に参加した（発表論文 1）。

2) HP1 のヒンジ領域 HR 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。天然変性領域 (IDR)であることがわかった。DNA 結合の効果は見られないが、グリセリン中ではナノ秒域で運動束縛が起こった。CD の N 末端の擬似リン酸化変異によって、HR と N 末端自身の運動性が阻害され、リン酸化調節が、N 末端領域が負電荷を帯び、HR の正電荷領域に結合することによる HP1 ダイナミクスの変化を伴って起こると示唆された。さらに分子に複数ラベルして、DEER からラベル間距離の複数の組み合わせ距離分布が見積もられた。一気に分子の全貌が解明できると期待する。

また、以前のスピンラベルタンパク質研究の成果をまとめて論文発表した（発表論 2、3）。

3) 宮田真人博士（大阪市大）の協力でおこなった予備実験で、スピロプラズマの繊維状タンパク質 Fibril モノマー当たり 2 個の天然システインをスピンラベルし、フィラメント多量体の構造を CW-ESR と DEER 距離測定によりマッピングした。DEER 信号からは、ラベル間の対角線長に対応する複数の距離分布が見積もられた。しかし、CW-ESR によると一部交換相互作用を含み、束化や aggregation が推定され DEER 信号の低下をよく説明された。

4) 前年度、宮田博士の協力でおこなった予備実験で、MnATP はモータータンパク質（6 量体）への結合と加水分解に伴って得られた CW-ESR スペクトルは、遊離の MnATP や MnADP、MnAMPPNP 並びにモータータンパク質に結合した MnADP、MnAMPPNP と異なっていた。この新しく得られたスペクトルのシミュレーションはむずかしく、ヘテロ配位構造を仮定する必要があるであろう。

1) T. Kanda, M. Kitawaki, Y. Matsuki, and T. Fujiwara, *RSC Adv.* 10, 8039 (2020).

2) C. Zhao, T. Somya, S. Takai, S. Ueki, and T. Arata, *Sci. Rep.* 9(1), 15259 (2019).

3) T. Arata, *Int. J. Mol. Sci.* 21(2) E672 (2020).

