

2021 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

## 研究成果報告書

(1) 事業名 (下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。)

超高磁場 NMR

(2) 研究代表者

氏名： 星野 大

所属機関名・部局名・職名：京都大学大学院・薬学研究科・准教授

(3) 研究課題名 (申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。)

低酸素ストレス応答を引き起こす Mint3-FIH1 相互作用の NMR 解析

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：宮ノ入 洋平 (研究室名：高磁場 NMR 分光学)

(5) 研究成果の概要 (公開)

Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) は解糖系や血管新生を亢進する低酸素応答に関わる転写因子であるが、酸素存在下においては factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) により厳密に抑制されている。一方、Munc18-1-interacting protein 3 (Mint3) が FIH-1 と結合することで間接的に HIF-1 の転写活性を促進することが示された。このことは、がん細胞などにおいて、通常酸素濃度下で低酸素ストレス応答と同様の代謝経路を活性化する「ワールブルグ効果」の主要因ではないかと考えられる。本研究では、Mint3 と FIH-1 の分子認識機構を明らかにすることを目的として、NMR を用いた相互作用解析を行った。

生化学的研究から、Mint3 の N 末端部 214 残基が FIH-1 との相互作用に関与することが示されている。同領域 Mint3(1-214) からなる部分蛋白質を調製し、相互作用解析に用いた。

140 mM NaCl, 10 mM NaPi (pH 7.3), 5% D2O 4°C において Mint3(1-214) の 1H-15N 相関スペクトルを測定したところ、観測されたピークは 7.5~8.5 ppm の領域に局在していた。よって、Mint3(1-214) は測定条件において高度に変性していることを確認した。

15N 標識 Mint3NT に対して様々な濃度の非標識 FIH-1 を添加することで、スペクトルの変化を調べた。その結果、FIH-1 の有無により Mint3NT のピーク位置は変化せず、ピーク強度のみが減弱することが明らかとなった。次に、ピーク強度比を残基番号順にプロットすると Mint3(1-214) の中央部の幅広領域 (50-150 残基め) の領域において FIH-1 の濃度依存的にピークが減弱することが分かった。部位特異的アミノ酸変異実験から Mint3 の (78-88), (101-110) が相互作用に重要な領域だと示唆されている。この領域で顕著に運動性が低下し、それに追従して周辺の領域もピークがブロードニングしたと推察される。

本研究により、Mint3(1-214) の分子中央部のおよそ 100 残基にわたる幅広い領域が FIH-1 との相互作用に関与している可能性が示された。