

2022 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。)

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：荒田敏昭

所属機関名・部局名・職名：大阪公立大学・大学院理学研究科・特任教授

(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。)

DNP-NMR 法によるスピラベルタンパク質の構造解析

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名： 藤原敏道 (研究室名：機能構造計測学研究室)

(5) 研究成果の概要 (公開)

HP1 はドメイン構造 N-tail-CD-HR-CSD-C-tail を形成し、CSD 同士が二量体を作る。HR(Hinge region), N-tail, C-tail は Intrinsic Disorder Region (IDR) である。ここでは、HR, N-tail, C-tails, CD, CSD のダイナミクスをスピラベルと ESR 分光法(Arata, 2020)で調べた(Suetake et al. 2021,2023)。HP1 α の HR の特定の amino 酸をシステインに変異させて、その側鎖にニトロキシスピラベルを結合させた。CW-ESR スペクトルは、50%グリセリン中では 2 つの運動成分 S, F (ns ~ slower time scale) に分解された。より固定化された slow 成分 S は、HR95, 103, 110 と C-tail183 で 50-80% あったが、HR85 と N-tail では 20-30% しかなかった。HR103 の slow 成分は N-tail 切断により 70% から 40% に減少し単量体変異により消失したが、他の残基では変化しなかった。C-tail の基部 183 の slow 成分 >50% は HR-CD-N-tail を切断した CSD-Ctail では 15% に減少し、C-tail 先端 191 でさえ slow 成分が 20% から約 5% 減少した。一方、HR110 の slow は C-tail 切断によって 80% から 40% に減少したが、他の残基では変化しなかった。これらの結果は、一方のモノマーの N-tail が直接的または間接的に他方のモノマーの HR103 領域と相互作用し、C-tail はモノマー内で HR110 領域と接触して形成される自己抑制状態を示唆する。このような IDR の HR の織りなす動的配置を直接的に明らかにするため、パルス ESR スピン間距離計測法でも調べている。

DNA 結合はグリセリンの有無によらず、ほとんど効果がなかった。グリセリン非存在下で、HP1 α に DNA が結合していても(ゲルシフトで確認)、HR と 2tails のスピラベルは DNA 非存在下と同様にサブナノ秒の時間スケールで非常に高い回転運動性を示した。一方、HP1 α の CD と CSD のダイナミクスは、HR が DNA に結合することによって明らかに制限され、同じナノ秒の回転相関時間に達したが、DNA 結合しない HP1 γ は制限されなかった。そこで HP1 α は HR と非特異的な DNA とのファジー複合体として非常に速いスライド拡散し、CD と CSD は DNA の周りに同様のダイナミクスで繋がれていると示唆され、最近の分子動力学シミュレーション(Watanabe et al. 2018) とも一致する。【主な発表論文】©Dynamics of the HP1 Hinge Region with DNA Measured by Site-Directed Spin Labeling-EPR Spectroscopy, I. Suetake, K. Sato, T. Sugishita, Y. Mishima, T. Takei, T. Fujiwara, R. Mutoh, A. Shinohara, T. Takui, M. Miyata, H. Hojo, T. Arata, *Appl. Mag. Reson.*, **54**, 119-141 (2023 年 1 月) (©印は本事業の謝辞記載)