

(様式 1-1)

提出日：2023 年 5 月 12 日

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：岩崎憲治

所属機関名・部局名・職名：筑波大生存・ダイナミクス研究センター・教授・学長補佐

(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。)

滑膜肉腫関連タンパク質の構造解析および関連治療薬開発のための 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 分光学研究室)

(5) 研究成果の概要 (公開)

**\*背景および目的、方法と結果、について、公開して差し支えない範囲で 1 ページ以内で記載。**(1) 二次元 NMR による SSX1<sub>111-188</sub> 及び SSX2<sub>111-188</sub> の構造解析

<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N ラベルをした SSX1<sub>111-188</sub> 及び SSX2<sub>111-188</sub> の二次元 NMR を測定し、主鎖の帰属を行った結果、SSX1<sub>111-188</sub> と SSX2<sub>111-188</sub> の主に C 末端領域において異なる構造を形成していることが示唆された。この結果から SSX1<sub>111-188</sub> と SSX2<sub>111-188</sub> のアミノ酸残基の違いにより構造が変化することで、SSX1<sub>111-188</sub> には存在する DNA 結合モチーフが SSX2<sub>111-188</sub> では存在しない可能性が考えられた。

(2) 二次元 NMR による SSX1<sub>111-188</sub> 及び SSX2<sub>111-188</sub> に対する dsDNA の滴定実験

化学シフト摂動法による解離定数の測定を試みた。SSX1<sub>111-188</sub> に順次 DNA を添加しながら <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトル測定を行った。DNA の滴下に伴いわずかにスペクトルが変化していることが確認できた。SSX1<sub>111-188</sub>:DNA=1:0 と SSX1<sub>111-188</sub>:DNA=1:2 で比較すると、点線で囲んだシグナル強度の減少や、緑の矢印で示した化学シフトの変化が確認され、これらの変化が観察されたアミノ酸残基が DNA との相互作用に関与している可能性が考察された。dsDNA 滴定に伴い、W164 側鎖のシグナルも強度が小さくなることが確認できた。H166 側鎖についてもシグナル強度低下やシフト変化が確認された。<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルの重ね合わせ図で顕著にシグナル強度の減少が確認された W164 及び H166 について、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC スペクトルの重ね合わせ図の結果と合わせると、これら二残基は dsDNA との相互作用残基であることが両結果から推測できた。SSX1<sub>111-188</sub> の 160-180 残基周辺で顕著なシグナル強度の減少と、化学シフトの変化が見られた。従って、SSX1<sub>111-188</sub> は 160-180 残基周辺で dsDNA と相互作用していることが示唆された。しかし、二次元 NMR は構造が変化した領域のシグナルも変化するため、具体的な相互作用残基を特定することは難しい。そのため、今後は変異体作製による相互作用残基の特定と、変異による SSX1<sub>111-188</sub> の構造変化について考察する必要がある。

また、SSX1<sub>111-188</sub>:DNA=1:0 から SSX1<sub>111-188</sub>:DNA=1:10 まで dsDNA を滴下することにより得られた SSX1<sub>111-188</sub> 主要残基の化学シフト変化をまとめた図を図 3-7-6 に示した。この変位から、 $K_D = 114.6 \pm 2.04 \mu\text{M}$ 、 $k_{\text{off}} = 2936.6 \pm 256.8 \text{ s}^{-1}$  と求められ、SSX1<sub>111-188</sub>-dsDNA 相互作用は非常に弱く早い相互作用であるが、非特異的相互作用とは断定できない有意な相互作用であると考察した。