

2023 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 ・ 超高磁場 NMR ・ クライオ電子顕微鏡 ・ 客員フェロー

(2) 研究代表者

氏名：北原亮

所属機関名・部局名・職名：立命館大学・薬学部・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。)

タンパク質と核酸を対象とした超高磁場 NMR 装置を用いた高圧力 NMR 研究

(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 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。**

[タンパク質および核酸のコンフォメーション平衡に関する研究]

<背景>これまで圧力が球状タンパク質のコンフォメーション平衡をシフトさせる例を数多く示した。抗菌薬の創薬ターゲットであるジスルフィド結合形成酵素 DsbA についてコンフォメーション平衡の研究を行った。これまでに、大腸菌由来 DsbA の酸化型、還元型および阻害剤複合体について、 $^1\text{H}$  および  $^{15}\text{N}$  化学シフトの圧力による非線形応答から、高圧力下でコンフォメーション平衡が変化することを見出した。

立体構造を有する RNA について、塩基のフリップイン-アウトなどコンフォメーションの多型が報告されている。圧力可変の 1 次元および 2 次元  $^1\text{H}$ -NMR 測定を行い、コンフォメーション平衡について研究を行った。

<方法と結果>今年度は、主鎖アミドグループの水和状態の情報を得るために、Cleanex-PM 測定を行い、酸化型、還元型の比較、加圧による変化について研究した。また、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識 DsbA に対し、阻害剤候補化合物の滴定実験を行った。さらに、阻害剤複合体について圧力実験を行い、阻害剤の解離/会合平衡の圧力依存性について研究を行い、解離/会合に伴う体積変化を算出した。

RNA について 0.1~250 MPa の範囲で高圧力 NMR 測定 (NOESY, TOCSY)を行った。イミノプロトンシグナルの帰属を確認し、加圧に伴う化学シフト変化について解析を行った。

[タンパク質の液液相分離に関する研究]

<背景>タンパク質の液液相分離(LLPS)について、高圧顕微鏡、高圧紫外可視吸光度測定から、加圧により RNA 結合タンパク質 fused in sarcoma (FUS)の LLPS がとけ、2.7 kbar 以上で再び LLPS が出現することを発見した (Li et al. JPCB 2021, PCCP 2022, Kitahara et al. JACS 2021)。また、FUS の神経細胞内での凝集は家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症と強く関わっている。ALS 疾患型変異体 R495X について、高圧化で安定化される LLPS について、野生型に比べ一層凝集性が高いことを見出した。高圧力化で安定化される LLPS の構造情報は、疾患メカニズムの解明、創薬研究において重要である。そこで、超高磁場の高圧力 NMR 法により液液相分離(LLPS)や凝集などタンパク質集合体の研究を計画した。

<方法と結果>今年度は、 $^{15}\text{N}$  標識  $\alpha$  シヌクレインについて、pH 依存的な LLPS 形成を顕微鏡観察により確認し、併せて  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC 測定を行った。FUS について、NMR 観測可能な試料条件の検討中である。