

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

(2) 研究代表者

氏名：織田 昌幸

所属機関名・部局名・職名：京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・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。)

金属イオン結合に伴い構造変化する蛋白質の構造および熱力学的解析

(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：先端計測研究室)

(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。**

蛋白質の構造機能制御において、金属イオン結合に伴う構造変化が重要となる事例は多く、特に弱い金属イオンによる酵素機能の制御は、酵素全般での構造機能相関としても注目される。本研究では、RNA/DNA ハイブリッドを加水分解する酵素 RNaseHI と、PET を加水分解する酵素 Cut190、さらに金属イオン結合によりヘリックスバンドル構造を形成する人工タンパク質 HA シリーズを対象として、主に NMR や等温滴定熱量計 (Isothermal Titration Calorimetry; ITC) を用いた解析を進めている。HA は、ヘリックスバンドル構造形成時に、金属イオンが配位する His の他に、Ala がコア領域に位置するようデザインしているが、この Ala 相当部位に、Val、Ile、Leu をそれぞれ配した HV、HI、HL を調製し、金属イオン結合に伴う構造変化の違いを、主に円二色性分散 (CD) や ITC により解析した。さらに HA と HL の構造変化の詳細を解明すべく、各サンプルの  $^{15}\text{N}$  ラベル体を調製し、 $\text{Zn}^{2+}$  滴定に伴う HSQC シグナルの変化を解析した。特に HL では、CD で観測される二次構造変化は小さいものの、HSQC シグナルの変化は、化学シフト、シグナル強度の変化、いずれも大きく、溶液中での動的な構造変化も示唆された。RNaseHI については、ITC 解析により、活性化能の高い  $\text{Mg}^{2+}$  が、他の金属イオンに比して RNaseHI への結合力が弱く、結合比も約 1.5 と、他の金属イオンが約 1 である結果と異なり、過渡的な複合体形成、さらに同形成が活性発現時に重要である可能性が示唆された。今後は、金属イオンが配位する水分子の活性発現時の役割にも焦点をあて、NMR による解析を進めたい。Cut190 も、活性発現時に  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とし、主に X 線結晶構造解析により、様々な構造状態を解明した。RNaseHI での  $\text{Mg}^{2+}$  同様、Cut190 への  $\text{Ca}^{2+}$  結合も  $\text{Mn}^{2+}$  や  $\text{Zn}^{2+}$  など他の金属イオン結合に比して弱く、Cut190 と  $\text{Ca}^{2+}$  との過渡的な複合体形成が、動的な構造変化とリンクし、活性発現に影響すると考えられ、現在、 $^{15}\text{N}$  ラベル体の調製を試みており、NMR による構造機能相関解析を行う予定である。