

(様式 1-1)

提出日：2025 年 5 月 7 日

2024 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、ほかは削除してください。）

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ください。）

DNP-NMR 法によるスピン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：松木陽

（研究室名：機能構造計測学研究室）

(5) 研究成果の概要

*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記載。

ヒストン修飾リーダーとしてヘテロクロマチンタンパク質 HP1 は、メチル化ヒストン H3K9me3 間で分子カスガイとなり、ヘテロクロマチンを安定化し長時間にわたってエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わっている。HP1 は、N-tail-CD-HR-CSD-C-tail という構造をとり CSD がダイマーを形成し、ヒンジ領域(HR)と 2 つの tails は IDR である。各ドメインの回転ダイナミクスをスピンラベルと ESR 分光法¹で調べている^{2,3}。高タンパク濃度では、HP1 は DNA 結合やリン酸化で液液相分離(LLPS)が起き、高密度の液滴内で効率良いヘテロクロマチン凝縮を起こすと考えられている。今回、高タンパク濃度を模倣する 3%PEG8000 中で、リン酸化模倣 SD 変異+H3K9me3 で LLPS が増強され>40%が液滴化し、HP1 はオリゴマーを形成すると考えられた。ニトロキシスピンラベル MSL で標識された CD ドメインのナノ秒運動の強い抑制が CW-ESR で観測されたが、IDR (HR, N-tail)のサブナノ秒運動は弱く束縛され、スピン間相互作用(<2nm)はどちらも認められなかった。LLPS 中に凍結した HR, N-tail のパルス ESR によるスピンエコーの速い T2 減衰と弱い二重共鳴信号(感度 1.5-8nm)¹から、強い凝縮状態を示唆する矛盾した結果を得たので、HP1 の LLPS をリン酸化依存的に促進し、かつ凍結中に分子を disperse させる凍結保護溶媒や架橋ハイドロゲルを検討した。次に 2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid, TOAC スピンラベルをリン酸化主鎖に強固に固定して合成した N-tail ペプチドを HP1 後部に連結して全長 HP1 を半合成し、IDR 主鎖 backbone の回転が ESR によってはじめて直接測定された(論文準備中)。非リン酸化 HP1 と比較して、リン酸化 HP1 は、H3K9me3 の存在下 LLPS 中では、N-tail 主鎖 TOAC のナノ秒運動(回転相関時間)を 1 桁近く抑制した。ESR 信号変化が大きいため、リン酸化残基数や位置を操作して、DNA やヒストンによる HR, tails 等 IDRs の主鎖ダイナミクス変化を精度よく調べることができると期待される。1) Arata, *Int. J. Mol. Sci.* 21, E672 (2020). 2) Suetake *et al.*, *BBRC.* 567, 42-48 (2021). 3) Suetake *et al.*, *Appl. Mag. Reson.* 54, 119-141 (2023).