

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。)

超高磁場 NMR

(2) 研究代表者

氏名： 森田 勇人

所属機関名・部局名・職名：城西大学・理学部・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ください。)

PEND タンパク質の N 末 DNA 結合領域が細胞内局在を制御する構造要因

(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

PEND タンパク質は、顕花植物であるエンドウ豆から同定された葉緑体内膜局在 DNA 結合タンパク質である。613 アミノ酸から構成されており、その N 末側には、非回文配列を認識する bZIP 型構造をとる DNA 結合領域 (cbZIP : 147 AA) が存在する。cbZIP の N 末には、15 アミノ酸残基から成るプレ配列が結合しており、細胞内での発現直後のプレ配列を結合した PEND タンパク質は、葉緑体へ移行した後、プレ配列切断により成熟 PEND (mPEND) になることで二量体を葉緑体内膜上で形成し、葉緑体 DNA への結合活性を発現すると考えられている。このように、cbZIP はプレ配列の有無により PEND タンパク質の「二量体形成」、「DNA 結合活性」、「細胞内局在」を制御すると考えられることから、本研究では、cbZIP のプレ配列の有無による構造変化 (単量体⇄二量体平衡ならびに、溶液構造)、非回文配列の分子認識機構解明の超高磁場 FT-NMR を用いた解明を目的とした。

本年度は、cbZIP (プレ配列を含むものと欠損したもの) をコードする cDNA を pET-50b(+) の SmaI, HindIII サイトに挿入することで作製したプラミズドを大腸菌 RosettaGami2(DE3) に組み込むことで作出した発現系を用いて、NusA-cbZIP 融合タンパク質の大量発現を行った。作出した融合タンパク質は HRV-3C プロテアーゼで処理することで NusA タグの除去を行い、常法に従い精製濃縮を行うことで、NMR 等による分析のための試料を作出した。目的タンパク質の安定同位体標識は、<sup>13</sup>C グルコース、<sup>15</sup>N 塩化アンモニウムを添加した M9 培地を用いることで行った。作出した試料を用いてこれまでに以下の研究成果を上げることができた。

1) 精製 cbZIP の単量体⇄二量体平衡をサイズ排除クロマトグラフィーで解析したところ、プレ配列を除去することで二量体の割合が上昇するものの、プレ配列が存在しても一部は二量体を形成している可能性が示唆された。二量体形成の平衡定数の詳細な定量解析のために貴施設の分析超遠心システムの利用を検討している。

2) 次に、プレ配列の有無に伴う溶液構造の変化を解析する目的で、それぞれの状態の cbZIP を FT-NMR による溶液構造解析が可能な濃度域 (~0.5 mM) まで濃縮を行ったところ、5%以上のグリセロールを加えないと 24 時間程度 (25 °C) で試料溶液の白濁が生じた。今後、5%グリセロール存在かでプレ配列有無における cbZIP の溶液構造比較を行っていく予定である。