日本学術振興会に紙媒体で提出する必要はありません。

2版

様　式　Ｆ－７－１

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成２９年度）

機関番号	１４６０３

所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学
研究代表者	部局	物質創成科学研究科
	職	准教授
	氏名	松尾　貴史

１．研究種目名　基盤研究(C)(一般)　　２．課題番号　17K01947

３．研究課題名　金属酵素の機能制御機構における酵素分子全体の動的構造効果：モデル蛋白質による検証

４．補助事業期間　平成２９年度～平成３１年度

５．研究実績の概要

金属含有酵素の固有機能を司る中心金属イオンの反応性は、金属配位部位の局所的構造効果のみならず、生体高分子としての性質も関与していると予想される。そのことを、実験データによって証明するために、シンプルな構造をもつチオールサブチリシンをモデル蛋白質として、この蛋白質中に唯一存在するCys残基であるCys221を配位子とするCu(II)錯体を構築した。そして、このCu(II)中心の反応性が、Cu中心から離れたところに存在するCa(II)イオンの結合状態によって影響を受けるかどうかを各種分光学的に手法によって検討した。まず、Ca(II)イオンの結合状態による蛋白質二次構造への影響は、CDスペクトルによりほとんどないことが確認された。次に、Cu(II)錯体の形成についてUV-vis、ICP-MSによって確認し、Ca(II)イオンが正常に結合している状態では、1:1の安定なCu(II)錯体として単離できることを見いだした。一方、Ca(II)イオンが脱離した状態では、蛋白質二次構造が類似しているにも関わらず、Cu(II)錯体の形成は見られなかったことから、CDスペクトルには反映されない蛋白質主鎖の柔軟性が重要なファクターであることが示唆された。そこで、Ca(II)の結合状態が異なる蛋白質を作り分けし、アミドH/D交換後の質量分析を実施したところ、Ca(II)イオンの有無により主鎖の運動性を大きく支配されることが分かった。さらに、電子スピン共鳴によって、Ca(II)イオンの結合状態はCys配位Cu(II)錯体の自動還元挙動にも影響を与えることが示された。Cu(II)錯体とCu(I)錯体では安定な錯体構造は異なる。よって、主鎖の構造柔軟性が自動還元のしやすさを制御しており、蛋白質全体のグローバルな構造柔軟性が、小さな金属イオンの反応性を制御していることが実験的に証明できた。

６．キーワード

金属酵素　サブチリシン　構造柔軟性　動的構造効果

７．現在までの進捗状況

区分　（2）おおむね順調に進展している。

理由

蛋白質全体の構造効果の重要性が実験的に証明され、学術誌に報告する段階まで至った。

８．今後の研究の推進方策

自動還元後の銅錯体の構造の詳細な構造的知見を得るために、蛋白質の結晶化を試みるとともに、溶液中において、構造柔軟性効果が、Ca(II)結合サイトから、Cu錯体中心へ、どのように伝搬していくのか、その伝搬経路を特定するために、溶液NMRおよびペプシン消化によるペプチドフラグメント解析を実施する。

９．次年度使用が生じた理由と使用計画

29年度に実施予定であった実験のうち、蛋白質の結晶構造解析において、構造解析に適した品質の良い結晶を得ることが困難であったため、結晶化条件の再検討のための結晶化キットの購入および学外実験に伴う機器使用代、旅費に必要な895,211円を30年度分の助成金と合わせて請求する。

１０．研究発表（平成２９年度の研究成果）

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Matsuo Takashi、Kono Takamasa、Shobu Isamu、Ishida Masaya、Gonda Katsuya、Hirota Shun	４．巻 24
２．論文標題 Global Structural Flexibility of Metalloproteins Regulates Reactivity of Transition Metal Ion in the Protein Core: An Experimental Study Using Thiol-subtilisin as a Model Protein	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Chem. Eur. J.	６．最初と最後の頁 2767～2775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/chem.201705920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計5件（うち招待講演　2件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 松尾貴史、菖蒲勇、石田昌也、河野尊匡、廣田俊
２．発表標題 タンパク質内部の遷移金属イオンの性質とタンパク質構造柔軟性：チオールサブチリシンをモデルタンパク質とした相関関係の実験的検討
３．学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
４．発表年 2017年

日本学術振興会に紙媒体で提出する必要はありません。

１．発表者名 松尾貴史
２．発表標題 タンパク質の動的構造効果による機能制御
３．学会等名 第３０回生物無機化学夏季セミナー（招待講演）
４．発表年 2017年

１．発表者名 三宅輝幸、松尾貴史、廣田俊
２．発表標題 金属錯体-金属錯体相互作用のスイッチングを目指したCoサレン錯体修飾アデニル酸キナーゼの物性評価
３．学会等名 錯体化学会第67回討論会
４．発表年 2017年

１．発表者名 松尾貴史、三宅輝幸、藤井亮、菖蒲勇、河野尊匡、廣田俊
２．発表標題 タンパク質の構造的二面性に立脚した反応場の機能制御
３．学会等名 第66回高分子討論会
４．発表年 2017年

１．発表者名 Takashi Matsuo, Takefumi Yoshida, Chie Imai, Shun Hirota, Kazumo Wakabayashi,
２．発表標題 Construction of “metathesase” with protein scaffold and potential application of olefin metathesis as a biochemical tool
３．学会等名 International Congress of Pure and Applied Chemistry-2018(ICPAC-2018)（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

１１．研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件／うち取得0件）

１２．科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

１３．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

－

１４．備考

松尾貴史ホームページ
http://mswebs.naist.jp/LABs/hirota/tmatsuo/matsuo_jpn.html