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)

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、CDスペクトルには反映されない蛋白質主観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観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。				機関番号	1 4 6 0 3
研究 代表者 展表程度 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  平成 2 9年度 - 平成 3 1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、金属配位部位の同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するい。特別で、あるい。2221を配位子とするの(11) 34体を構築した。そして、このの(11) 中心の反応性が、Cu中心から離れたところに存在する(11) 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よがを各種分よって検討した。まず、Ca(11) イオンの結合状態によるでいことが確認された。次に、Cu(11) 34体の形成についていいい。いの場には、五年度には、国会国工機造が類似しているにも助わらず、Cu(11) 34体をはしては、日本により主義の運造が整理している。そのこと、表別では、11の受定なの(11) 34体をしているによりま物の変型をなっアクターであることが示決された。そこで、Ca(11) の経合状態が異なる蛋白質を作り分けし、アミド内の支後の電気が作を実施したとさる。Ca(11) イオンの精合状態により主義の運造が整理となど、全気を含むることが分かった。さらに、電子スピン共鳴によって、Ca(11) イオンの結合状態がよりなる部白質を作り分け、アミド内の政権を引動が実なる部白質を作り分け、アミド内の政権の主義が生がの対していることが方式を指している。よって、主義の構造を数性が自動通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条数性が、小さな全質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。  7 . 現在までの進捗状況 区分 (2) あおむね順調に進度している。 理由	所属研究	機関名称	奈良先端科学技術大学院大学		
代表者   代表   代表   代表   代表   代表   代表   代表	四本		物質創成科学研究科		
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  金属各有解系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、シンブルな構造をもフチオールサブチリシンをモデル蛋白質として、この重白質中に唯一存在するのys教長であるのys教長を担合化子とするのに(1)針なの総合社際によってのの(11)サルの反応性が、(21)サインの影合は、次に、(21)対すなの影響は、のスペクトルによりほとんどないことが密接された。次に、(21)13様から形成についてがいいま、(Dr. Mict. ao 工作制度)が無限したときな。(21)17オンが規能したが観念された。次に、(21)17オンが成態したが悪では、蛋白質二次構造が類似しているにも関わらず、(21)13様から形成は見られなかったことから、のスペクトルには反映されな計画で質量は約の条準性が重要のファクターであることが示唆された。こで、(21)17オンの状態では、近日の経合状態を表しておりの対しているにも関わらず、(21)113様から取りの総合状態を表態したとこる。(21)11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、電子スピン共鳴分けし、アミドHの交換後の類金分形態に外配で(21)13様から関連元学動にも影響を与えることが示された。ことが分かった。さらに、電子スピン共鳴分け、カアミドHの交換を関値の場合が関心であり、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。		職	准教授		
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 金属含育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ンシをモデル蛋白質として、この蛋白質中に唯一存在するCysk残器であるCys222を配分子とするCu(1) 当体を構築した。そして、この(1)(1) 当体を構築した。そして、この(1)(1) 当体を構築した。として、この(1)(1) 当体を構築した。として、この(1)(1) 当体を構築した。として、この(1)(1) 当体を構造された、次に、Cu(1)(1) 当体の形成についていい。ICP-NBC (1) Cu(1)(1) 対かの総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らからからを種分光学的に手法によって検討した。ます、Ca(1)(1) インの結合状態によるで確認した。は、Cu(1)(1) 対かが収集した状態では、1:1の安定なな(1)(1) 当体を形成に見られなかったことから、DOスペクトルには反映されたは自由管理を作り分けし、アミドルの交換後の関重分析を実施したところ、Ca(1)(1)イオンの指令大能の主要が対していることが分かった。さらに、電子スピン共鳴によって、Ca(1)(1)イオンの結合状態はCys配位Cu(1) 対体の自動還元学動にも影響を与えることが示された。Cu(1) 3結合状態が構造は異なる。よって、主緒の構造業軟性が見動造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業軟性が、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		氏名	松尾 貴史		
4 . 補助事業期間	1 . 研究種	目名	基盤研究(C)(一般) 2 .	課題番号	17K01947
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プ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い3残基であるい3221を配位子とするCu(II) 鎖体を構築した。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で強いことが確認された。次に、Cu(II) 鎖体の形成についてUV-Vis. ICP-USIC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) 鎖体として単離できることを見いだした。一方、Ca(II) イオンが開業した状態では、蛋白質二次構造が類似しているにも関わるが、Cu(II) 鎖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自質主観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) イオンの会合状態により変配位な(II) 遺体の自動造元参していることが分かった。さらに、電子スピン共鳴によって、Ca(II) イオンの公合代能していることが含かった。さらに、電子スピン共鳴でよって、主組の構造柔軟性が自動遺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。	3 . 研究謝	<b>果題名</b>	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	
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、シンブ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)緒体を構築した。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)緒体の形成についてUV・vis、IDP-MSによって確認し、Ca(II)イオンが近常に結合している状態では、CDスペクトルによりほとんどな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)緒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国台質主義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番目質を作りがし、DF1ドリク支援の質量分析を実施したところ、Ca(II)イオンの無により主義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。  2	4 . 補助事	業期間	平成29年度~平成31年度		
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	あるCys221で響を受けるが 響を受けるが いしとでは いしたで から、 から、 でして とたけって、 でる。 よって、	を配位子とすかどうかとろいどうかを名認された。次でころこのとのことをいいます。 (D スペクトミドH/D交換(2 (II)) イ構造 主鎖の構造	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、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)錯体の	:するCa(II)イオ: 影響は、CDスペパ :いる状態では、1 oらず、Cu(II)錯f Ca(II)の結合状態 とが分かった。さ とCu(I)錯体では5	ノの結合状態によって影 フトルによりほとんどな フトルによりほとんどな :1の安定なCu(II)錯体 本の形成は見られなかす 終が異なる蛋白質を作り らに、電子スピン共鳴 安定な錯体構造は異な
区分 (2)おおむね順調に進展している。 理由			構造柔軟性 動的構造効果		
	区分 (2 理由	) おおむね順	<b>調に進展している。</b>		

#### 【研究代表者・所属研究機関控】

### 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

8.今征	後の研!	究の推	進方策							
自動還元	後の銅	錯体の権	構造の詳細	は構造的知	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	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)

「粧砂調文」 司 1件(つら直説19調文 1件/つら国際共者 0件/つらなーノングクセス 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	5.発行年
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	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)	査読の有無
10.1002/chem.201705920	有
オープンアクセス	国際共著
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	-

# 〔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

	2 版
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 b	piochemical 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	

# 【研究代表者・所属研究機関控】

# 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

〔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

://mswebs.naist.jp/LABs/hirota/tmatsuo/matsuo_jpn.html	