

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）（令和元年度）

所属研究機関名称	奈良先端科学技術大学院大学		機関番号	14603
研究代表者	部局	先端科学技術研究科		
	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～令和2年度

## 5. 研究実績の概要

金属含有酵素の機能の発揮箇所である中心金属イオン部分の反応性が、生体高分子全体の構造柔軟性とカップルしているという知見から、1)人工金属酵素の反応性制御が構造柔軟性によって可能であること、2)構造柔軟性効果が金属配位部位に伝搬する経路の解明を行うために、大腸菌によるサブチリシンカールスバーグの発現系の構築を試みた。分子シャペロンとして機能するプロドメインを有する全長チオールサブチリシンをコードするプラスミドを調製し、Ser221Cys変異による自己活性化への影響を検討した。その結果、サブチリシンの活性部位の変異によって、自己活性化速度は著しく低下するが、最終的にはプロドメインの切断が起こった成熟型サブチリシンが生成することが明らかとなった。しかし、成熟型タンパクの収率は30%程度であり、また、CDスペクトルによる二次構造への影響を検討し、化学修飾によって調製したタンパク質と比較としたところ、部分的な変性が見られ、自己活性化およびその後の精製方法の検討が必要なことが示唆された。生成した成熟型タンパク質はCu(II)やZn(II)などの遷移金属を結合する能力をがあることをICP-MSによって確認し、これまでの研究の知見と総合させて、生体高分子全体の構造柔軟性制御によって反応性を変化させることのできる人工金属酵素の構築において、サブチリシンがフレームワークとなるモデルタンパク質として有効であることが実証された。
--

## 6. キーワード

金属酵素 サブチリシン 金属配位 補助配位子
------------------------

## 7. 現在までの進捗状況

区分 (3) やや遅れている。
理由 構造柔軟性効果が伝搬経路解明に必要な変異体構築に必要な人工遺伝子の入手が、新型コロナウィルス感染拡大に伴う発注先の操業停止に伴い困難となつたため、変異体構築が遅れている。

## 8. 今後の研究の推進方策

期間延長手続きをすでにを行い、発注先の操業が再開されたので、入手次第、変異体発現系の構築およびタンパク質調製を行い、変異位置による構造柔軟性効果への影響を明らかにする。

## 9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

新型コロナウィルス感染症拡大に伴う実験材料の入手困難が生じたため、次年度使用額が生じた。実験材料の入手次第、変異体発現系の構築およびタンパク質調製を行い、変異位置による構造柔軟性効果への影響を明らかにする。

## 10. 研究発表（令和元年度の研究成果）

[雑誌論文] 計3件 (うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件)

1. 著者名 Takashi Matsuo, Teruyuki Miyake, Shun Hirota	4. 卷 60
2. 論文標題 Recent Developments on Creation of Artificial Metalloenzymes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tetrahedron Lett.	6. 最初と最後の頁 151226(1-8)
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2019.151226	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 -

1. 著者名 Rini Majumder, Snigdha Roy, Kentaro Okamoto, Satoshi Nagao, Takashi Matsuo, Partha Pratim Parui	4. 卷 36
2. 論文標題 Porphyrin-based Probe for Simultaneous Detection of Interface Acidity and Polarity during Lipid Phase Transition of Vesicles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 426-434
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.9b02781	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 該当する

1.著者名 Teruyuki Miyake, Ryosei Tamaki, Moeko Asanuma, Yoji Fukada, Shun Hirota, Takashi Matsuo	4.巻 31
2.論文標題 Regioselective Chemical Modification of Cysteine Residues on Protein Surfaces Focusing on Local Environment around the Conjugation Sites	5.発行年 2020年
3.雑誌名 Bioconjugate Chem.	6.最初と最後の頁 794-802
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.9b00869	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4件(うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1.発表者名 Teruyuki Miyake, Yoji Fukada, Shun Hirota, Takashi Matsuo
2.発表標題 Sequential Conjugation of Different Molecules onto Protein Surface and Comparison of Reactivities of Cysteine Residues
3.学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15) (国際学会)
4.発表年 2019年

1.発表者名 杉田達郎、百武篤也、山本泰彦、松尾貴史、廣田俊、鈴木秋弘、根矢三郎、莊司長三、渡辺芳人
2.発表標題 ヘム鉄の軸配位子としてイミダゾールをもつミオグロビンの研究
3.学会等名 第46回生体分子科学討論会
4.発表年 2019年

1.発表者名 松尾貴史、三宅輝幸、廣田俊
2.発表標題 システイン残基周辺の局所的環境の違いを利用したタンパク質化学修飾の反応制御
3.学会等名 第19回蛋白質科学会年会
4.発表年 2019年

1. 発表者名 玉置棕星、三宅輝幸、浅沼萌子、松尾貴史、廣田俊
2. 発表標題 アデニル酸キナーゼ三変異体(A55C/C77S/V169C)の表面システイン残基の反応性に対する局所的構造要因の検証
3. 学会等名 日本化学会第100春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

## 1 1. 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）

## 1 2. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

## 1 3. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
インド	Jadavpur University	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

## 1 4. 備考

-