

様 式 F-7-2

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実績報告書（研究実績報告書）

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

金属含有酵素は、生体高分子であるタンパク質の内部に金属配位部位をもち、この金属配位部位の反応性が金属酵素の機能の源である。本研究では、この金属配位部位の反応性に対するタンパク質部分の構造効果を検証するために、システイン残基を1個有するチオールサブチリシンをモデルタンパク質として検討を実施してきた。本年度は、チオールサブチリシンの構造柔軟性を部位特異的アミノ酸置換によって制御するために、まず、大腸菌発現系によるチオールサブチリシンカールスバーグおよびサブチリシンEの取得プロトコルの確立を行い、このプロトコルがSer221をシステインに変換した変異体の取得にも適用可能かどうかを検証した。

カールスバーグ種、E種ともに、分子シャペロンとして機能するプロドメインを有するプロサブチリシンとして発現されるようにプラスミドベクターを構築し、IPTGを用いた発現誘導系によって、タンパク質発現を試みた。その結果、プロサブチリシンの発現を電気泳動等で確認でき、タンパク質の取得に成功した。昨年度までの結果で、カールスバーグ種のプロチオールサブチリシンは自己消化によって成熟化酵素に変化することが分かっていたが、E種では、プロドメイン部分の変異が自己消化速度を加速させた。成熟化したチオールサブチリシンに対して、2-プロモメチルピリジンを作用させると、Ser221Cysがピリジルメチル化され、Cu(II)の添加により、金属イオンがタンパク質内に安定に保持されることがICP-MSによって示された。つまり、新たに添加されたピリジンとCys221およびHis64の三座配位による金属錯体がタンパク質内に形成され、バッファー中のカルシウム濃度に依存して、Cu(II)の自動還元速度が変化した。以上から、両種類のサブチリシンにおいて、タンパク質に結合した遷移金属イオンの反応性が、タンパク質の構造柔軟性によって制御され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. 研究発表

〔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 Jatmika Catur, Goshima Kenta, Wakabayashi Kazumo, Akiyama Naoki, Hirota Shun, Matsuo Takashi	4. 巻 49
2. 論文標題 Second-coordination sphere effects on the reactivities of Hoveyda-Grubbs-type catalysts: a ligand exchange study using phenolic moiety-functionalized ligands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 11618～11627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0dt02353a	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 —

3 版

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉置 椋星、三宅 輝幸、廣田 俊、松尾 貴史
2. 発表標題 タンパク質表面システイン残基の化学修飾に対する局所的構造効果の検証
3. 学会等名 日本化学会第101春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山 直生、Catur Jatmika、五嶋 健太、廣田 俊、松尾 貴史
2. 発表標題 Hoveyda-Grubbs型錯体の構造修飾 (1)：第二配位圏効果による錯体の安定性および触媒活性制御
3. 学会等名 日本化学会第101春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 伊武輝、Catur Jatmika、秋山 直生、廣田 俊、山口 浩靖、松尾 貴史
2. 発表標題 Hoveyda-Grubbs型錯体の構造修飾 (2)：生体分子への固定化反応の適用
3. 学会等名 日本化学会第101春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

8. 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）

9. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

10. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

—

1 1. 備考

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