

(様式 1-1)

提出日：2025 年 4 月 16 日

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。)

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：織田 昌幸

所属機関名・部局名・職名：京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・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。)

金属イオン結合に伴い変化する蛋白質の動的構造解析

(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 分光光学研究室)

(5) 研究成果の概要

*背景および目的、方法と結果について、公開して差し支えない範囲で記載。

金属イオン結合が蛋白質の構造機能制御に重要となる事例は多く、特に弱い金属イオンによる制御は、酵素全般での構造機能相関としても注目される。放線菌由来のクチナーゼ様酵素 Cut190 も、Ca²⁺結合により活性発現するが、Ca²⁺結合は他の二価金属イオン結合より弱く、その作用メカニズムは興味深い。これまでの Cut190 各種変異体と Ca²⁺や Zn²⁺との複合体や、基質との複合体でも、複数の X 線結晶構造が得られ (Numoto et al., *Biochemistry* 57, 5289, 2018; Senga et al., *J. Biochem.* 169, 207, 2021; Emori et al., *Proteins* 89, 502, 2021; Numoto et al., *Int. J. Biol. Macromol.* 281, 136597, 2024 など)、Ca²⁺結合と解離に伴う Cut190 の構造変化が示されており、この構造変化を動的挙動も含めて、NMR を用いて解明することを目指している。本年度は、Cut190 分子内にジスルフィド結合を導入し、安定化した変異体 Cut190**SS を用い、これを ¹⁵N 均一標識し、¹H,¹⁵N HSQC 測定を行った。同酵素の分子量は 29 k であるが、各シグナルが分散した良好なスペクトルが得られた。さらに Ca²⁺と Zn²⁺を、それぞれ滴定し、個々の ¹H,¹⁵N HSQC 測定を行った結果、いくつかのシグナルで化学シフト変化が認められ、内いくつかでは、Ca²⁺と Zn²⁺で異なる化学シフト変化が観測された。これらの結果は、Ca²⁺と Zn²⁺の各結合により、Cut190**SS で異なる構造変化が誘起されたことを示唆する。さらに ¹³C,¹⁵N 均一標識した Cut190**SS を調製し、各シグナル帰属に向けて、各種三次元 NMR 測定を行っている。