

(様式 1-1)

提出日：2026 年 5 月 9 日

2025 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：櫻井 一正

所属機関名・部局名・職名：近畿大学・先端技術総合研究所・准教授

(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。）

アロステリック制御・残余構造に関わるタンパク質動的分子構造変化の理解

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：宮ノ入洋平准教授（研究室名：高磁場 NMR 分光学 研究室）

(5) 研究成果の概要

タンパク質の動的構造（運動性や構造状態平衡）の変化による、機能変化のメカニズムの解明を目指している。その一つとして、アロステリック機構の解明のため、Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 5（ENTPD5）というタンパク質に着目した。ENTPD5 は小胞体内への糖の取込みとその糖鎖による生産タンパク質の品質管理に関わる。特定のガン細胞では発現量が亢進しているため、その阻害によるガン抑制を目標とし、まず ENTPD5 反応のキャラクタリゼーションを行った。

P. pastoris 発現系にて ENTPD5 を発現し、NMR による酵素活性解析を行った。その際、得られた ENPTD5 には異なる糖鎖付加状態が存在し、それぞれの酵素活性に変化があることを発見した。この結果から、細胞の糖取込み能には ENTPD5 の活性が自身の糖鎖付加状態で変化することを利用したフィードバック機構があることが示された。ENTPD5 の AlphaFold 構造から、糖鎖付加により活性部位の変化を引き起こすことが示され、上記の実験を裏付ける仕組みがあることを示した。

また期間内に、タンパク質の動的構造に関わるもう一つのテーマとして、出芽酵母の分泌シグナル配列の構造状態にも着手した。 α 接合因子の N 末端側にあるシグナル配列は強力な分泌発現を誘導するため、異種発現にも用いられる。シグナル配列自身の変異や下流に結合するタンパク質に依存し発現量が変化することが知られているが、そのコンストラクトと発現量がどのように関連するのかは未知であった。シグナル配列は特定の構造をとらないと考えられる、その構造アンサンブル状態に発現量を左右する仕組みがあると考え、そのシグナル配列のキャラクタリゼーションを試みた。

シグナル配列部分を大腸菌で二重標識し、主鎖帰属用の HNCACB、CBCACONH、HNCO、HNCACO を行った。そのデータの解析の結果、HSQC 信号帰属を 100% 達成できた。その後、各種分泌量増加変異体を発現し、 T_2 測定や CLEANEX-PM といった NMR 測定を行い、どのような構造・運動状態が分泌量に影響を与えるか、そのメカニズムを提案した。

