

(様式 1-1)

提出日：2026 年 4 月 24 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：近藤 未菜子

所属機関名・部局名・職名：浜松医科大学 先進機器共用推進部 技術職員

(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。）

人工タンパク質の多量体化によるヘム結合サイトの設計手法の開発

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：古賀 信康

(研究室名： 蛋白質デザイン研究室)

(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。

計算機シミュレーションの発展により、近年ではタンパク質構造を主鎖レベルから設計することが可能となってきた。基質結合タンパク質の設計では、天然または既存の人工タンパク質に内在する空洞に対して側鎖設計を行うことで小分子結合能を付与する手法が広く用いられているが、このような手法は既存構造に依存するため、結合様式や空間配置に制約がある。本研究では、既存の空洞に依存せず、目的とする基質に適した空洞そのものを新規に設計するとともに、その結合様式を実験的に検証することで、より自由度の高い設計手法の確立を目指した。そのために、安定な人工タンパク質ドメインを連結し、さらに多量体化を組み合わせることで、ドメイン界面に新規な基質結合部位を形成する設計戦略を採用した。ターゲットとしては、生体内で重要な役割を担うヘムに対して高い結合能を有するタンパク質の設計を行った。ドメイン間の連結には多量体形成能を持つヘリカルバンドルをリンカーとして用い、2つのドメインを接続するとともに、多量体化によりヘム結合ポケットの安定化を図った。構成ドメインには古賀研究室で設計された8種類の人工タンパク質を用い、Pythonによりドメイン連結、多量体化、および結合ポケットの評価を行うスクリプトを整備した。さらに、結合様式の再現や界面設計、側鎖最適化にはタンパク質設計ソフトウェア Rosetta を用いた。ドメイン組み合わせの中から、Rosetta エネルギーに基づき5種類の設計モデルを選択し、大腸菌での発現・精製および生化学的評価を行った。今年度はこれまで未評価であったモデルについて新たにヘム結合実験を実施した結果、従来の測定条件では評価が難しく、結合特性を十分に測定しきれていない可能性が示唆された。そこで、ヘム結合実験条件の再検討を行い、特に塩濃度の調整および測定手法の改善を通じて、より安定かつ再現性の高い評価系を確立した。その上で、5種類すべてのモデルについてヘム結合実験の再測定を実施し、結果の再現性の検証および定量的評価を行った。さらに、ヘム結合に関与すると考えられるヒスチジン残基を他のアミノ酸に置換したノックアウト変異体を作製し、結合能への影響を比較することで、設計した結合様式の妥当性および設計原理の検証を行った。