

(様式 1-1)

提出日：2024 年 5 月 7 日

2023 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、ほかは削除して下さい。)

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下さい。)

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 (公開)

***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 1 ページ以内で記載。**

計算機シミュレーションにより近年では様々な構造のタンパク質が主鎖構造から自在に設計されるようになってきた。その中で、基質結合タンパク質の設計では、天然のものや人工設計されたタンパク質の空洞の側鎖設計を行うことで小分子との結合能が実現されてきた。本研究では、すでに構造中に存在する空洞を利用する手法ではなく、これまで知られている構造に制限されることなく、目的となる基質に合わせた空洞を自在に設計する新たな手法の開発を目指している。基質結合タンパク質の設計において、タンパク質構造の安定を保ちつつ、内部の空間を自在に設計する技術が必要となる。そこで、我々が有するタンパク質設計技術を用いて、これまでに設計され安定な構造を持つ人工タンパク質をドメインとしてつなげ、さらに多量体化することで、ドメイン界面に基質結合部位を持つタンパク質を設計することに挑戦した。本研究では具体的なターゲットとして、酸素の運搬や酵素反応の活性中心として生体内で重要な役割を果たすヘムに高い結合能を持つタンパク質の設計を目指している。ドメインをつなぐリンカーとして多量体を形成するヘリカルバンドルを用い、2 つのドメインを連結した上で、さらにヘリカルバンドルを使って多量体化し、ヘム結合ポケットの安定化を目指した。ドメインとして使用する人工タンパク質として、古賀教授の研究室で作られた 8 種類の構造を使用し、ヘリカルバンドルは二量体化が報告されている構造を使用した。Python を使用してヘリカルバンドルとドメインの末端を連結し、多量体化を行い、さらに、ドメイン界面にヘムが結合可能かどうかを判定するスクリプトの開発を行った。また、より具体的な結合状態の再現やドメイン間の界面、多量体化を行った際に新たに生じる界面と、ヘム結合サイトの側鎖設計には蛋白質設計ソフトウェア Rosetta を用いた。様々なドメインの組み合わせのうち、Rosetta エネルギーにより構造の安定性とヘム結合能を評価し、5 種類の設計モデルに関して大腸菌を用いて発現、精製し、生化学実験を行った。サイズ排除クロマトグラフィーを行い、ピークの保持時間から目的とする二量体化が優位に実現されているモデルかどうかを判別した。さらに、ヘム結合能を調べるために、精製されたタンパク質とヘムを滴定・反応させ、ヘムの吸収スペクトル測定を行い、ヘムの結合状態を解析した。