

# モデルタンパク質を用いたドメインスワッピング二量体の立体構造評価 Structural analyses of a domain-swapped dimer of a model protein

真壁幸樹\*, 志賀翔太

山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻, 〒992-8510 米沢市城南 4-3-16

Koki Makabe and Shota Shiga

Yamagata University, 4-3-16 Jyonan, Yonezawa, 992-8510, Japan

## 1 はじめに

生体高分子である蛋白質の中には、分子同士がさらに会合して大きな構造体を形成し機能するものが多く存在する(蛋白質の四次構造)。このような大きな構造体を形成するメカニズムの一つにドメインスワッピングがある。これはドメイン構造中の一部を他分子と交換し自発的に高次化する機構であり多数の生体蛋白質から見いだされている(図1)。

ドメインスワッピングを用いて、蛋白質の高次構造設計を目指す研究はこれまで数多く行われてきたが、大きな構造ユニットの挿入が必要など汎用的な方法はなかった。

そこで本研究では、申請者がこれまでに蛋白質の再設計に用いて来たモデル蛋白質 *OspA-sm1*[1]を用いてドメインスワッピングを誘導するミニマルな変異導入を検討した。

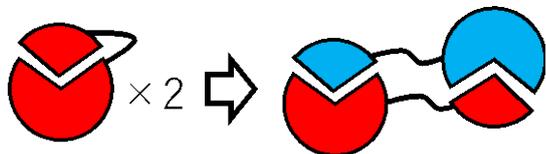


図1 ドメインスワッピング二量体形成の模式図。二つの蛋白質の同じ構造領域を交換して二量体が形成する。

## 2 実験

*OspA-sm1* の発現ベクターにドメインスワッピングを誘導する変異を導入し、大腸菌 BL21(DE3)組換え体として発現させた。Ni-NTA カラムによる精製を行い、分析サイズ排除クロマトグラフィーで会合状態を評価した。二量体を形成するものに関してはサイズ排除クロマトグラフィーで最終精製を行なった。ループ欠失変異体  $\Delta 2$ ,  $\Delta 4$  およびループ欠失プロリン挿入変異体  $\Delta 6\text{Pro}3$ ,  $\Delta 6\text{Pro}6$  について結晶化に成功した。 $\Delta 2$ ,  $\Delta 4$  変異体に関しては PF-BL1A にて、 $\Delta 6\text{Pro}3$  変異体は PFAR-NE3A にて、 $\Delta 6\text{Pro}6$  変異体は PF-BL5A にて X 線回折データを収集した。

## 3 結果および考察

以前の NMR を用いた研究から *OspA* の C 末端ドメインはあるループ部位を介して大きく構造が開

く可能性が示唆されていた[2]。そこでこのループ領域を 2, 4, 6 残基欠失させ、繋がれている二つの構造間に立体障害を導入し開いた構造からドメインスワッピングさせる変異体を作製した。作製した変異体はそれぞれ  $\Delta 2$ ,  $\Delta 4$ ,  $\Delta 6$  変異体と命名した。

しかしこれらのループ欠失変異体は単量体のままであった。ループが欠失しているのにもかかわらず、どのようにして単量体で存在するかを明らかにするために、結晶構造解析を行った。 $\Delta 2$ ,  $\Delta 4$  の二つの変異体について分解能 1.3 Å および 1.4 Å にて結晶構造解析に成功した(図2)。結晶構造からループが短くなっているにもかかわらず、構造が再構成されて開いた構造が形成していないことが分かった。

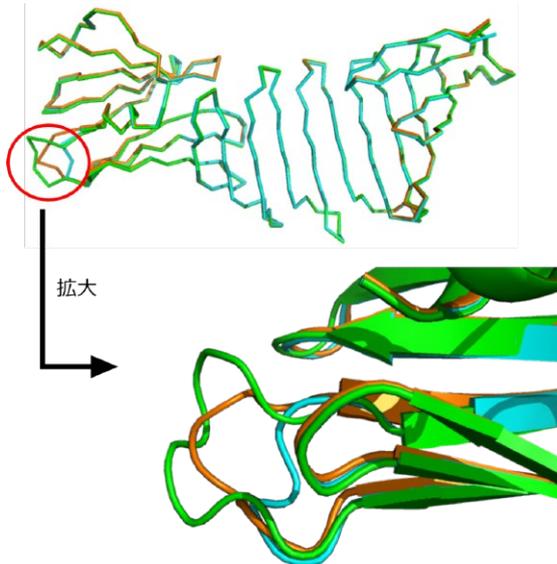


図2 ループ欠失変異体の構造。*OspA-sm1* (緑)、 $\Delta 2$  (オレンジ)、 $\Delta 4$  (シアン)。ループ構造が再構成されているのが分かる。

そこで、 $\Delta 6$  にプロリンを挿入した変異体を構築した。それら変異体は二量体を形成し、特にプロリンを3つと6つ導入した変異体( $\Delta 6\text{Pro}3$ ,  $\Delta 6\text{Pro}6$ )では顕著に二量体の割合が増加した(図3)。

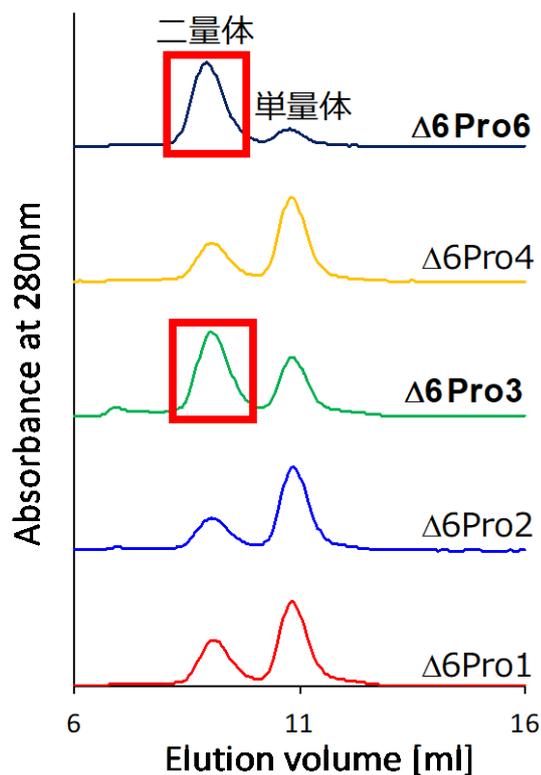


図3 Δ6にプロリンを1~6残基挿入した変異体のサイズ排除クロマトグラフィーの結果。

Δ6Pro3 および Δ6Pro6 の結晶構造の決定にそれぞれ、分解能 2.8 Å および 2.0 Å にて成功し、ドメインスワッピングによって二量体化していることが分かった (図4)。

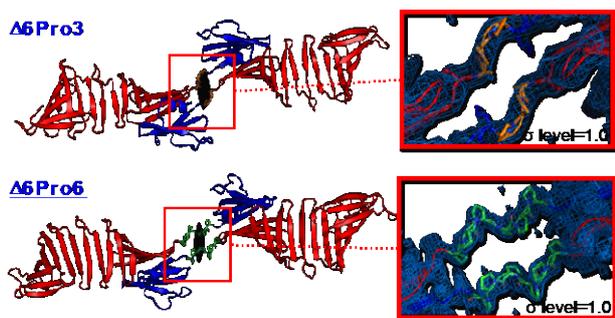


図4 Δ6Pro3 および Δ6Pro6 の結晶構造。右に変異導入部位の電子密度マップを示した。電子密度から明確にドメインスワッピングしていることが分かる。

以上の結果から、蛋白質構造のループ領域に欠失とプロリン挿入という単純なデザインでドメインスワッピングを人工的に設計することができる事が示せた。

#### 謝辞

OspA 発現ベクターはニューヨーク大学小出昌平教授よりご恵与いただきました。感謝いたします。

#### 参考文献

- [1] K. Makabe *et al.*, *Protein Science*. **15**, 1907 (2006)
- [2] NH. Pawley *et al.*, *J Mol Biol.* **324**, 991 (2002)

\* makabe@yz.yamagata-u.ac.jp