

3D ドメインスワッピングにより配向調節されたホモ 2 価小型結合タンパク質の構造評価

Crystal structure analysis of homobivalent small binding proteins with orientation regulated by 3D domain swapping

志賀翔多^{1,*}, 渡邊秀樹¹

¹産業技術総合研究所 モレキュラーバイオシステム研究部門, 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央事業所 6 群

¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Molecular Biosystems Research Institute, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

1 はじめに

小型結合タンパク質を連結して作製されるホモ 2 価小型タンパク質は阻害剤やアゴニストとして機能する。近年、ホモ 2 価小型タンパク質中の結合ドメインの配向が結合親和性に影響することが報告されているため、これらの配向調節技術の開発の重要性が増している。化学修飾や遺伝子工学的な配列改変による配向調節技術が報告されているが、簡便性や改変規模の観点から開発の余地があるため、配向調節技術の拡張が重要である。

本研究では、遺伝子工学的に簡便に、ミニマルな改変でホモ 2 価小型結合タンパク質の配向を調節出来る技術の開発を志向し、タンパク質の多量体化機構である 3D ドメインスワッピングを利用した配向調節を試みた (図 1)。

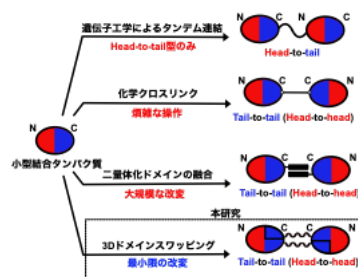


図 1 既存の小型結合タンパク質の配向調節技術と本研究で提案する配向調節技術

2 実験

3D ドメインスワッピングにおいて単量体タンパク質はお互いの構造の一部を交換して多量体化する。この際、交換される構造は、単量体の三次構造上の N 末端または C 末端側から供給されるため、形成する二量体は head-to-head もしくは tail-to-tail 型の 2 通りの配向をとりうる。そこで、我々が以前の研究で確立した、ループへの剛直なポリプロリン配列の挿入による 3D ドメインスワッピングタンパク質の設計技術を、小型結合タンパク質の任意のループに対して施すことで、ミニマルな改変によるホモ 2 価小

型タンパク質の配向技術が達成出来ると考えた[1]。小型結合タンパク質のモデルとして、抗体結合小型タンパク質である Protein G の GB1 ドメインの安定化変異体 (WT) を用いた[2]。WT の任意のループに対してポリプロリン配列を挿入した変異体を作製した。変異体は大腸菌 BL21 (DE3) で組換え体として発現させた。可溶画分での発現の有無、溶液中でのサイズ、二次構造、抗体への結合能をおのこの SDS-PAGE, Size exclusion chromatography (SEC), Circular dichroism (CD), Surface plasmon resonance (SPR) で評価し、結晶化を達成した変異体の結晶構造解析を行った。実験的評価とタンパク質設計を双方向的に行うことで、所望の配向を持つホモ 2 価小型タンパク質の設計を試みた。本研究で設計した変異体のうち、ポリプロリン挿入変異体 L3-P6 及びシステイン含有ポリプロリン挿入変異体 L3-P2CP3, L3-P3CP3, L2-P3CP3 の二量体画分の結晶構造解析に成功した。L3-P6, L3-P3CP3 は PF BL-5A, L3-P2CP3, L2-P3CP3 は PF AR-NW12A にて X 線回折データを収集した。

3 結果および考察

まず、WT の三次構造上で C 末端側に位置するループ(L3)に 6 個の連続したプロリンからなるポリプロリンを挿入した変異体を作製した。L3 は先行研究において、コア領域の変異により誘導される 3D ドメインスワッピング二量体を形成する際にヒンジ領域として機能し、スプリット箇所ともなることが報告されており、3D ドメインスワッピングを誘導するための改変部位として適当であると推察した[3, 4]。作製した変異体を L3-P6 と命名した。実験的特性評価の結果、L3-P6 は可溶で抗体への結合力を保っていない単量体であると判断した。設計の評価をすべく、単量体画分の結晶構造解析を行った所、2.5 Å で構造解析に成功した。得られた結晶構造から、L3-P6 は結晶環境中で tail-to-tail 型の 3D ドメインスワッピング二量体として存在することが明らかになった (図 2)。

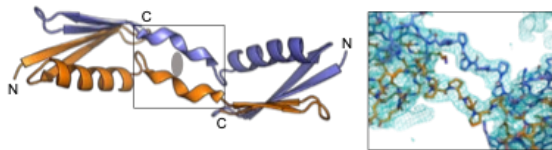


図 2 L3-P6 の結晶構造。楕円は 2 回対称軸を示す。四角内はポリプロリン部分の電子密度マップを示す。

3Dドメインスワッピング二量体を溶液中で安定化させるために、ポリプロリン鎖間への分子間ジスルフィド結合の導入を試みた。L3-P6 の二量体の結晶構造を元に、ジスルフィド結合に適した位置関係にあるプロリン残基を選定し、システインに置換した変異体とポリプロリン配列の中心にシステインを挿入した変異体の 2 通りを設計した。これらの変異体を L3-P2CP3, L3-P3CP3 と命名した。L3-P2CP3, L3-P3CP3 はどちらも、溶液中で抗体への結合親和性が低下したジスルフィド結合性の二量体として存在することが明らかになった。設計の評価のため、二量体画分の結晶構造解析を試みた所、おのおの分解能 2.9 Å, 2.5 Å での構造解析に成功した。L3-P2CP3 と L3-P3CP3 の結晶構造はどちらも tail-to-tail 型の 3D ドメインスワッピング二量体を形成していた。どちらの二量体も設計通りポリプロリン鎖上にジスルフィド結合が形成していることが分かった (図 3)。

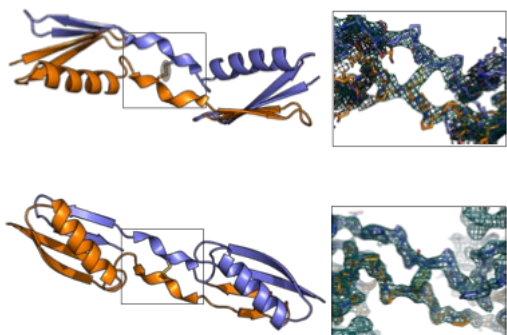


図 3 L3-P2CP3(上図)と L3-P3CP3 (下図)の二量体画分の結晶構造。四角内にポリプロリン部分の電子密度マップを示す。

ここまでの設計で、溶液中で安定な 3D ドメインスワッピング小型結合タンパク質二量体の作製に成功したが、これらの二量体は抗体への結合親和性が減弱していた。そこで、L3-P2CP3 と L3-P3CP3 の二量体の結晶構造をもとに、ホモ 2 価小型結合タンパク質二量体の創出に向けた設計戦略を立てた。結合親和性の低下の原因は 2 点あると考えた。1 点目は、ループ改変により、ループ中に存在する抗体への結合に関わる残基(Asp40)の構造変化である (図 4)。2 点目は L3-P2CP3 と L3-P3CP3 の二量体への結合に際して、二量体中の抗体結合サイトが近接することにより、抗体の Fc 領域間で生じることが示唆される立体障害である (図 4)。

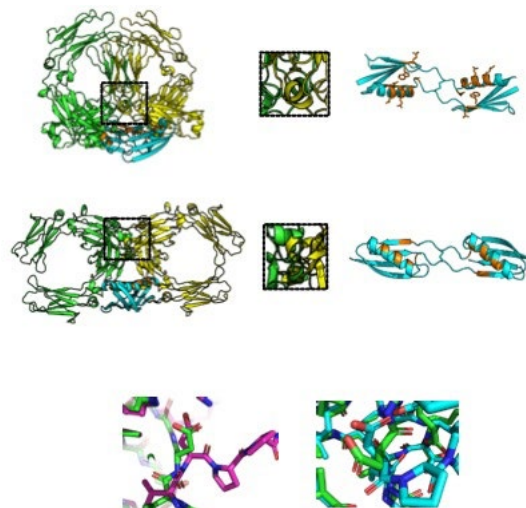


図 4 二量体と Fc 領域の複合体モデルと、二量体中の Fc 領域結合サイト (上、中段) および Asp40 の周辺の構造 (下段)。上段が L3-P2CP3、中段が L3-P3CP3 の複合体モデルである。四角内は立体障害が見られた箇所。二量体中の Fc 領域結合サイトは橙色で示した。下段左が WT と L3-P2CP3 を Asp40 で重ね合わせた図、下段右が WT と L3-P3CP3 を Asp40 周辺で重ね合わせた図である。

これらを解消すべく、WT の 3 次構造上で、L3 と擬対称的位置にあるループ(L2)を改変した。L2 は抗体との結合に関わる残基が存在していない。さらに、L3-P2CP3 と L3-P3CP3 の二量体と比較して抗体への結合サイトが離れた head-to-head 型の 3D ドメインスワッピング二量体が形成すると予想される。L2 に対し、ここまです実績のある 2 通りのシステイン含有ポリプロリンを挿入した変異体を設計した。これらの変異体をおのおの L2-P2CP3, L2-P3CP3 と命名した。L2-P2CP3 と L2-P3CP3 はどちらも、ジスルフィド結合性のホモ 2 価小型結合タンパク質二量体として機能することが示唆された。設計の評価のため、二量体画分の結晶構造解析を試みた所、L2-P3CP3 の結晶構造を分解能 2.9 Å で解析することに成功した。L2-P3CP3 の結晶構造は分子間ジスルフィド結合を持つ head-to-head 型の 3D ドメインスワッピング二量体を形成していた (図 5)。

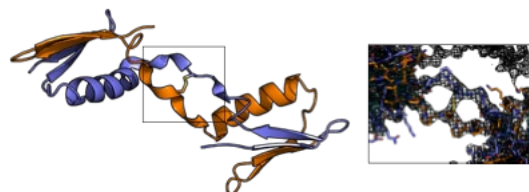


図 5 L2-P3CP3 の二量体画分の結晶構造。四角内にポリプロリン部分の電子密度マップを示す。

二量体中の結合サイト間の距離は tail-to-tail 型の二量体のものより離れており、Asp40 は WT と同様の構造をとっていた (図 6)。さらに、この二量体と Fc 領域の複合体モデルにおいて、Fc 領域間に明確な立体障害は観察されなかった (図 6)。L2-P3CP3 がホモ 2 価小型結合タンパク質として機能したのは、これらの特徴を反映したからかもしれない。

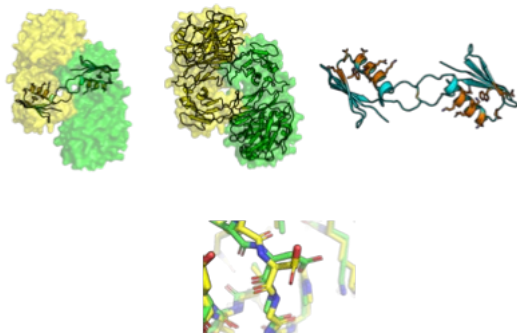


図 6 L2-P3CP3 の二量体と Fc 領域の複合体モデルと、二量体中の Fc 領域結合サイト (上段) および Asp40 の周辺の構造 (下段)。複合体モデルは二量体を明示したものと Fc 領域の二次構造を明示したものの 2 通りを示した。二量体中の Fc 領域結合サイトは橙色で示した。WT と L2-P3CP3 を Asp40 周辺で重ね合わせた。

4 まとめ

小型結合タンパク質の任意のループにシステイン含有ポリプロリンを挿入することで、3D ドメインスワッピングを介してホモ 2 価小型結合タンパク質の配向を調節出来ることを証明した。本研究は、ホモ 2 価小型結合タンパク質の配向調節技術の拡張のみならず、3D ドメインスワッピングデザイン的设计原理についての知見を与えるものでもある。

謝辞

結晶構造解析の際、ご助言頂いた久保田 智巳博士に感謝致します。

参考文献

- [1] Shiga, S *et al.*, *ChemBioChem.*, 20, 2454–2457 (2019).
- [2] Watanabe, H *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 284, 12373–12383 (2009).
- [3] Byeon, I.-J.L *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 333, 141–152 (2003).
- [4] Honda, S *et al.*, *Biochemistry.*, 38, 1203–1213 (1999).

成果

・論文

1. Regulating the orientation of homobivalent small binders through 3D domain-swapping design, Shota Shiga, Hideki Watanabe, Koki Makabe, Shinya Honda, *Journal of Biological Chemistry*, 302, 2, 2026

・学会発表

1. 3D ドメインスワッピングデザインによるホモ 2 価小型結合タンパク質の配向調節、志賀翔多、渡邊秀樹、真壁幸樹、本田真也、高分子学会関東支部 茨城地区若手の会(2024)
2. 非典型的な配向のホモ 2 価小型結合タンパク質の設計、志賀翔多、渡邊秀樹、真壁幸樹、本田真也、2024 年度量子ビームサイエンスフェスタ (2025)
3. Regulating the orientation of homobivalent small binders through 3D domain-swapping design Shota Shiga, Hideki Watanabe, Koki Makabe, Shinya Honda, The 25th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan. (2025)

* shota.shiga@aist.go.jp