

## ループ再設計による Outer surface protein A (OspA) のドメインスワッピング

志賀翔多<sup>1</sup>, 真壁幸樹<sup>1</sup><sup>1</sup>山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻

## Domain swapping of Outer surface protein A (OspA), by minimal loop design

Shota SHIGA<sup>1</sup>, and Koki MAKABE<sup>1</sup><sup>1</sup>Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University

## Abstract

ドメインスワッピングは蛋白質分子が分子間で構造領域を交換し多量体化する機構である。天然の蛋白質の多くは多量体として機能するため、蛋白質多量体のデザインは興味深い課題である。本研究では、Outer surface protein A (OspA) をモデル蛋白質として、どれだけ最小限の変更によってドメインスワッピングさせられるかを詳細に検討した。デザインの結果、C末端ドメイン中のループ上のアミノ酸6残基の欠失によるループの短縮および短縮部位に対する数個のプロリン(Pro)の挿入によりOspAの二量体化を達成した。本研究成果は、ミニマルなデザインにより、単量体として存在する蛋白質をドメインスワッピングさせられることを示している。

## 1. はじめに

天然に存在する蛋白質の多くは多量体を形成し、高次の構造をとることで機能している [1]。このことから、蛋白質多量体のデザインは興味深い課題といえる。近年、蛋白質多量体の多様なデザイン手法が編み出されており、蛋白質ナノ繊維やナノケージなどの蛋白質ナノマテリアルの作製が精力的に行われている [2-3]。

本稿では、蛋白質多量体の作製を指向したデザインの一例として、単量体として存在する蛋白質のドメインスワッピングを実現するデザインを紹介する。

ドメインスワッピングとは、蛋白質が多量体化する機構の一種である。概略図を Fig. 1 に示した。本機構では、蛋白質分子が分子間で構造領域を交換し多量体化する。この機構において重要な役割を果たすのがヒンジループである。ヒンジループを起点として開いた構造の単量体が形成し、疎水性の界面が溶媒に対して露出することで分子間に相互作用が生じ、多量体化する。本機構によって形成する多量体の形状は様々で、二量体や環状、直鎖状の多量体が生じる。

1994年にジフテリア毒素の二量体においてこの現象が

確認されてから今日に至るまで、天然においてドメインスワッピングしている蛋白質が数多く報告されている [4-5]。最近では、細菌べん毛の分子モーターの構成要素の一部や二本鎖RNAウイルスの一種であるバクテリオファージφ6のキャプシドがドメインスワッピングにより構築されていることが明らかになっており [6-7]、蛋白質が機能を発揮する上でドメインスワッピングによる多量体化が重要であることが伺える。

では、単量体として存在する蛋白質をドメインスワッピングさせるデザインは可能なのか？答えはいエスである。ヒンジループへの変異導入によるドメインスワッピング多量体のデザインがいくつか報告されている [5,8]。デザインの内容としては、ヒンジループの短縮・伸長およびその組成の変化や、ループ部位への蛋白質の挿入などがある [5,8-9]。

しかし、これらのデザインは、天然において既にドメインスワッピングすることが確認されている蛋白質の単量体を用いたものがほとんどで、単量体のみで存在する蛋白質のドメインスワッピングに成功した例は数例のみに留まっている。さらに、ヒンジループの長さや組成がドメインスワッピングの可否にどのように関わっているか明らかになっていないにも関わらず、ヒンジループのデザインの詳細な検討はほとんど行われておらず、一般的なデザイン指針は確立されていない。

これらの背景から、本研究では、単量体として存在する蛋白質をモデルとして変異導入によるより詳細なヒンジループのデザインを行い、ドメインスワッピング多量体の理論的な作製に向けたデザインの確立を目指した。

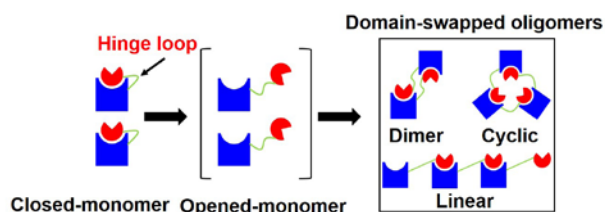


Figure 1 Basic mechanism of domain swapping.

## 2. モデル蛋白質 Outer surface protein A (OspA)

上記の目的達成のためには、「溶液中で単量体として存在」し、「変異導入の対象となるヒンジループを持つ」ことに加えて、「結晶化する可能性が高い」モデル蛋白質の選定が必要である。モデル蛋白質の結晶化の可否を重視する理由は、X線結晶構造解析を用いてデザインした蛋白質の構造を詳細に解析し、デザイン通りの構造を持っているかを評価するためである。本研究では、これらの条件を満たすモデル蛋白質として Outer surface protein A (OspA) の変異体である OspA-sm1 (sm は surface mutant の略) を選んだ。

OspA はライム病の原因となるボレリア菌の細胞外表面にて発現するリポ蛋白質である。この蛋白質の N 末端側の数残基は脂質結合部であり、脂質分子と結合することで菌の細胞膜に結合する。この N 末端部分を欠失させた変異型 OspA は、水溶液中で高い溶解性を持ち、単量体として存在する [10]。また、この変異型 OspA は、NMR を用いた主鎖のダイナミクス解析の結果、C 末端の球状ドメインがヒンジモーションをとることが示唆されており、同ドメイン中にヒンジループが存在することが明らかになっている [11]。OspA-sm1 はこの変異型 OspA に対して表面エントロピー減少法を適用し、結晶化しやすくした変異体である [12]。表面エントロピー減少法とは、蛋白質表面に存在する、コンフォメーション自由度が高い残基 (Glu や Lys など) をコンフォメーション自由度が低い残基 (Ala など) に変異させ、対象となる蛋白質の結晶化を促す方法である [13]。コンフォメーション自由度が高い残基は、結晶化に伴うコンフォメーションの固定化によってエントロピー障壁が生じるため、結晶化が妨げられる。これらの残基を、コンフォメーション自由度が低い残基に置換することでエントロピー障壁が解消され、結晶化が促される。変異型 OspA は単独での結晶化が不可能であるのに対し、OspA-sm1 は容易に結晶化することが分かっている。

これらの理由から OspA-sm1 をデザインのモデルとし、実験を行った。以後、本稿では、この OspA-sm1 を OspA と表記し説明を進めていく。

## 3. ヒンジループの短縮によるドメインスワッピングの誘導

OspA の C 末端の球状ドメイン中のループ上の 205 番目の Asp から 210 番目の Thr までの 6 残基をデザインの対象にした。この 6 残基を選んだ理由は、ヒンジ領域の予測ツールである Hinge-predictor [14] を用いた計算結果から、この領域がヒンジループとなる可能性が示唆されたためである。この結果は、NMR を用いた前述の研究で示されたヒンジループの箇所と一致した。

OspA のドメインスワッピングに向けた最初のデザイン戦略として、上記の残基の欠失によるヒンジループの短縮を行った。ループの短縮によってドメインスワッピングが誘導されるのは、ループの短縮に伴って生じる立体的な制約によりループ構造を取れなくなった結果、開いた構造の単量体が形成し、ドメインスワッピングするためである。

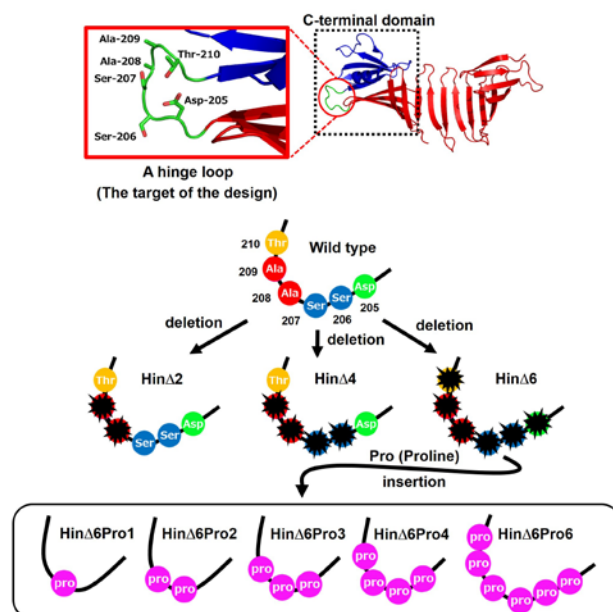


Figure 2 Deletion and proline mutations. The deleted residues are shown with black stars.

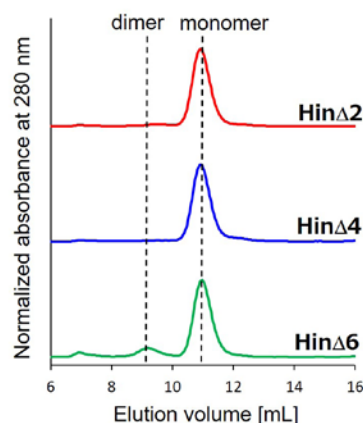
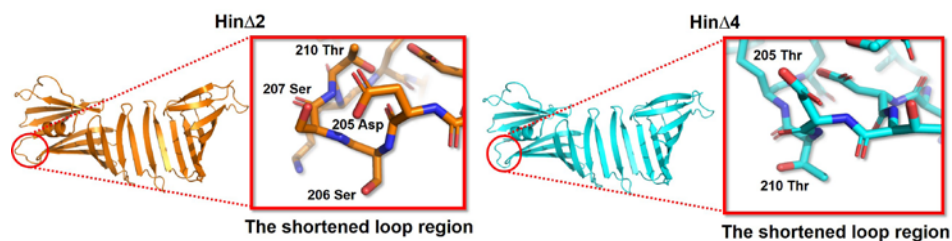


Figure 3 Size exclusion chromatography (SEC) chromatograms of deletion mutants. The elution curves show that all mutants are predominantly monomer.

このデザインは過去にいくつかの成功例が報告されており、ヒンジループ上のおおむね 2 から 6 残基の欠失によるループの短縮により、ドメインスワッピングの誘導が可能であることが示されている [5,8]。OspA の場合は、ヒンジループの短縮により、ループで連結された 2 つの構造領域に立体障害が生じ、開いた構造の単量体が形成することでドメインスワッピングすると考えた。そこで、OspA のヒンジループを構成する 205 番目の Asp から 210 番目の Thr までの 6 残基を、おのおの 2, 4, 6 残基欠失させた 3 つの変異体 (左から HinΔ2, 4, 6) を作製した。本デザインの詳細を Fig. 2 に示す。なお、ここでは、欠失させる残基の種類は考慮せず、あくまで残基数に注目してデザインを行った。

これらの変異体は大腸菌を用いて発現し、Ni-NTA カラムを用いて精製した後、サイズ排除クロマトグラフィーで分子量の評価を行った。結果を Fig. 3 に示す。ヒンジループ



**Figure 4** The crystal structures of HinΔ2 and HinΔ4. The shortened loops are restructured in both mutants.

プを最も短縮した HinΔ6 においてはわずかに二量体の形成が確認されたものの、全ての変異体において単量体が優勢に存在していた。

ヒンジループの短縮にも関わらず単量体が優勢なのは何か？この理由を調査すべく、これらの変異体のX線結晶構造解析を試みた。実験は PF BL-1A で行った。HinΔ2, 4 の結晶構造をおおの分解能 1.3 と 1.4 Å で解析することに成功した。空間群はどちらも  $P2_1$  であった。各々の構造を Fig. 4 に示す。得られた構造から、どちらの変異体もループが短縮し、再構築されていることが分かった。各々の短縮後のループの主鎖間や側鎖間、および主鎖と側鎖間に数本の水素結合の形成が見られた。この水素結合の形成によりループが安定化し、開いた構造の単量体が形成されなかったため、単量体が優勢化したと思われる。以上の結果から、ヒンジループの短縮のみでは OspA のドメインスワッピングを誘導出来ないと判断した。なお、HinΔ6 については、結晶化には成功したものの解析に適した良質な単結晶が得られなかったため、結晶構造解析には至らなかったが、HinΔ2, 4 と同様にループが短縮し、再構築されたために単量体が優勢化したと考えた。

#### 4. 短縮したヒンジループ部分へのプロリン (Pro) の挿入

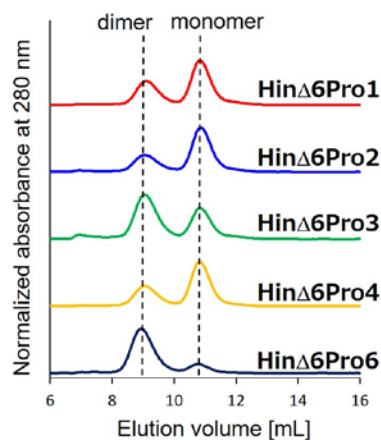
ヒンジループの短縮のみではループが再構築され、単量体が優勢に形成してしまう。この結果を受け、次のデザイン戦略として、ヒンジループが最も短縮されており、わずかに二量体の形成が見られた HinΔ6 の短縮部位に対するプロリン (Pro) の挿入を行った。Pro を挿入した理由は、ループ構造を壊すためである。Pro 以外のアミノ酸は主鎖のとりうる構造自由度の制限が小さいため、自由な構造をとりやすく、ループ構造をとりやすいのに対して、Pro は、自身が持つ環構造のために主鎖のとりうる構造自由度の制限が大きくなるため、自由な構造をとり辛く、ループ構造をとり辛い。よって、Pro の挿入によりループ構造をとれなくすることで、開いた構造の単量体が形成し、ドメインスワッピングするのではないかと考えた。

過去の研究から、ヒンジループ中のプロリンの存在とドメインスワッピングには密接な関係があることが示唆されている。天然においてドメインスワッピングにより多量体を形成する蛋白質のヒンジループ中に Pro がよく見られることが明らかになっている [15]。また、単量体とドメインスワッピング二量体の混合物として存在する蛋白質のヒンジループ中の Pro を別の残基に置換したり、その周辺の残

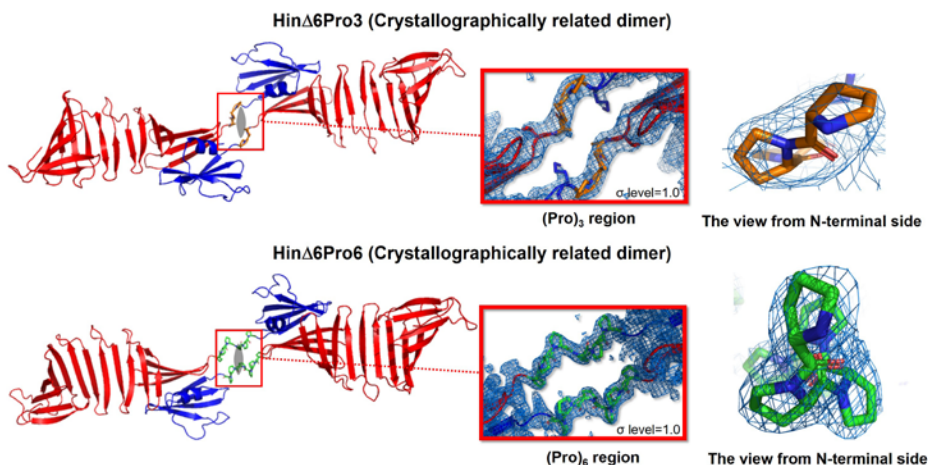
基を欠失させたりすることで、単量体と二量体の平衡状態を制御出来ることが分かっている [16]。いずれの例においても、Pro がループに対して与える歪みがドメインスワッピングを促すとされている。Pro によりループが歪むことで、閉じた構造の単量体が不安定化する。その歪みを解消するためにループが伸びた構造を取ろうとすることで開いた構造の単量体が形成しドメインスワッピングする。

以上の知見を参考にし、HinΔ6 のヒンジループの短縮部位に 1 から 4 個および 6 個の Pro を挿入した変異体を作製した (左から HinΔ6Pro1, 2, 3, 4, 6)。本デザインの詳細を Fig. 2 に示した。これらの変異体は、ループを短縮した変異体と同様に発現、精製し、サイズ排除クロマトグラフィーで分子量の評価を行った。結果を Fig. 5 に示す。全ての変異体において二量体の形成が確認された。これらの二量体は、単量体に戻る傾向は見られなかった。また、挿入する Pro の個数によって生じる二量体の量が変化する事が明らかとなった。HinΔ6Pro1, 2, 4 は単量体が優勢であったのに対し、HinΔ6Pro3 においては単量体と二量体がおおよそ 1:1 の割合で存在しており、さらに、HinΔ6Pro6 は二量体が優勢であった。

得られた二量体がドメインスワッピングしているかどうかを確かめるために、二量体が多く生じた HinΔ6Pro3 と HinΔ6Pro6 の二量体の X線結晶構造解析を試みた。実験は PF AR-NE3A および BL-5A で行った。どちらの二量体も結晶化に成功し、HinΔ6Pro3 を分解能 2.8 Å, HinΔ6Pro6 を



**Figure 5** Size exclusion chromatography (SEC) chromatograms of proline insertion mutants. The elution curves indicate the ratio of dimer and monomer differ widely with the number of inserted Pro.



**Figure 6** The crystal structures of domain-swapped dimer of HinΔ6Pro3 and HinΔ6Pro6. The electron density map of (Pro)<sub>3</sub> and (Pro)<sub>6</sub> region is shown.

分解能 2.0 Å で構造解析することに成功した。空間群はどちらも P3<sub>1</sub>21 であった。各々の二量体の構造を Fig. 6 に示す。どちらも非対称単位に開いた構造の OspA が 1 分子存在しており、ここに示した二量体は結晶学的に関連付けられた二量体である。これらの構造から、得られた二量体はドメインスワッピングしていることが分かった。Pro を挿入した箇所の電子密度マップがはっきりと見えており、一方の OspA 分子の C 末端側の構造領域が、もう一方の OspA 分子の残りの構造領域と相互作用し、二量体化していることが分かる。

HinΔ6Pro6 の Pro を挿入した箇所の構造にも注目して頂きたい。二量体が優勢であった HinΔ6Pro6 の Pro を挿入した箇所がポリプロリン II ヘリックス (PPII) を形成していたのである。PPII とは、トランス型の Pro が形成する 3 残基で 1 巻きの剛直なヘリックス構造である [17]。このヘリックス構造の形成により Pro を挿入した箇所が強く伸びたことで二量体が安定化し、優勢化したことが示唆された。

## 5. まとめと今後の展望

C 末端ドメイン中のループ上のアミノ酸 6 残基の欠失によるループの短縮および短縮部位に対する数個の Pro の挿入により OspA の二量体化を達成した。これは、ヒンジループのミニマルなデザインにより、単量体として存在する蛋白質をドメインスワッピングさせられることを示唆している。また、二量体が優勢化した HinΔ6Pro6 の Pro を挿入した箇所がポリプロリン II ヘリックス構造をとっていたことから、ヒンジループのポリプロリン II ヘリックスへの再設計がドメインスワッピング多量体のデザインに有用だと考えられる。

今後は、ヒンジループのデザインによるより高次の多量体の作製や、ヒンジループへ数個の Pro を挿入するデザインおよびそれに伴うループのポリプロリン II ヘリックス化が、OspA 以外の蛋白質のドメインスワッピング多量体化にも有効であるかを検討していきたい。

## 6. 謝辞

本稿で紹介した研究は、奈良先端大学院大学の廣田俊教授、山中優助教との共同研究によるものである。OspA プラスミドを寄与してくださったニューヨーク大学の小出昌平教授に感謝いたします。また、作製した変異体の X 線結晶構造解析は、PF AR-NE3A, BL-1A, BL-5A で行った。解析の際の PF スタッフの皆様方の惜しみない支援に感謝いたします。

## 引用文献

- [1] Neelan J. Marianayagam, Margaret Sunde and Jacqueline M. Matthews, *TRENDS in Biochemical Sciences* **29**, 11, 618-625 (2004).
- [2] Quan Luo, Chunxi hou, Yushi Bai, Ruibing Wang, and Junqiu Liu, *Chem. Rev.* **116**, 13571-13632 (2016).
- [3] Naoya Kobayashi and Ryoichi Arai, *Current Opinion in Biotechnology* **46**, 57-65 (2017).
- [4] M. J. Bennet, and David Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**, 3127-3131 (1994).
- [5] Nahren Manuel Mascarenhas, Shachi Gosavi *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **128**, 113-120 (2017).
- [6] Matthew A B Baker, Robert M G Hynson, Lorraine A Ganuelas, Nasim Shah Mohammadi, Chu Wai Liew, Anthony A Rey, Anthony P Duff, Andrew E Whitten, Cy M Jeffries, Nicolas J Delalez, Yusuke V Morimoto, Daniela Stock, Judith P Armitage, Andrew J Turberfield, Keiichi Namba, Richard M Berry and Lawrence K Lee, *Nature Structural and Molecular Biology* **23**, 197-203 (2016).
- [7] Zhaoyang Sun, Kamel El Omari, Xiaoyu Sun, Serban L. Ilca, Abhay Kotecha1, David I. Stuart, Minna M. Poranen and Juha T. Huiskonen, *Nature Communications* **8**, 14814.
- [8] Frederic Rousseau, Joost W. H. Schymkowitz, and Laura S. Itzhaki, *Structure* **11**, 243-251 (2003).
- [9] Joshua M. Karchin, Jeung-Hoi Ha, Kevin E. Namitz, Michael S. Cosgrove and Stewart N. Loh, *Scientific*

Reports 7, 44388 (2017).

- [10] Dunn JJ, Lade BN, Barbour AG, Protein Expr. Purif. **1**, 159-168 (1990).
- [11] Norma H. Pawley, Shohei Koide and Linda K. Nicholson, J. Mol. Biol. **324**, 991-1002 (2002).
- [12] Koki Makabe, Valentinereshko, Grzegorz Gawlak, Shude Yan, and Shohei Koide, Protein Science **15**, 1907-1914 (2006).
- [13] Zygmunt S. Derewenda, Structure **12**, 529-535 (2004).
- [14] Feng Ding, Kirk C. Prutzman, Sharon L. Campbell, and Nikolay V. Dokholyan, Structure **14**, 5-14 (2006).
- [15] Marc Bergdoll, Marie-Hélène Remy, Christine Cagnon, Jean-Michel Masson and Philippe Dumas, Structure **5**, 3, 391-401 (1997).
- [16] F. Rousseau, J. W. H. Schymkowitz, H. R. Wilkinson, and L. S. Itzhaki, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **98**, 5596-5610 (2001).
- [17] Prasun Kumar, Manju Bansal, Journal of Structural Biology **196**, 414-425 (2016).

(原稿受付日：2018年6月22日)

## 著者紹介

志賀翔多 Shota SHIGA



山形大学大学院 理工学研究科 バイオ  
化学工学専攻 博士前期課程2年  
〒992-8510 山形県米沢市城南4-3-16  
TEL: 0238-26-3237  
FAX: 0238-26-3237  
e-mail: tmf20423@st.yamagata-u.ac.jp

略歴：2017年3月山形大学工学部バイオ化学工学科卒業。  
2017年4月山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学  
専攻入学。

最近の研究：蛋白質設計による蛋白質多量体の作製。

趣味：バドミントン、バスケットボール

真壁幸樹 Koki MAKABE



山形大学大学院理工学研究科 准教授  
〒992-8510 山形県米沢市城南4-3-16  
TEL: 0238-26-3237  
FAX: 0238-26-3237  
e-mail: makabe@yz.yamagata-u.ac.jp.ac.jp

略歴：2012年山形大学准教授 博士（工  
学）

最近の研究：蛋白質工学，蛋白質設計，抗体工学。

趣味：アウトドア