

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05695

研究課題名(和文)ドメインスワッピングの熱力学的制御による選択的かつ安定なタンパク質分子複合体構築

研究課題名(英文) Selective and stable protein complex assembly by thermodynamic control of domain swapping

研究代表者

長尾 聡 (Nagao, Satoshi)

兵庫県立大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：30452535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質はアミノ酸配列によって立体構造が決まるが、タンパク質の構造が単量体になるか多量体になるかを定める要因は明らかではない。ドメインスワッピングは単量体のタンパク質の部分構造が分子間で交換して多量体構造をとる現象であり、多くの天然の単量体タンパク質に起こり得ることが知られている。本研究課題では、ドメインスワッピングを多量体構築のための手法として発展させることを目的とした。本課題では、ヒンジ領域のアミノ酸のヘリックス形成能を増加させる変異によって多量体の熱安定性が増加し、多量体の形成が促進することを見出した。さらに、ドメインスワップ構造の対称性を利用して多量体上に金属結合部位を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は生命現象の維持に必要不可欠の天然の機能性材料である。タンパク質の中には分子が複数集合して多量体となることで機能するものがあり、それを人工的に設計することが出来れば生体適合性が高く環境負荷の低い新規な機能性材料として利用できると期待される。本研究では、タンパク質を集合させる手法としてドメインスワッピングと呼ばれるタンパク質の構造交換現象を利用することを考え、ドメインスワッピングの促進をアミノ酸変異を用いた熱力学的な制御により可能とした。また、機能性材料としての応用を考え、ドメインスワップした多量体の分子対称性を利用した金属結合部位の構築も行った。

研究成果の概要(英文)：The amino acid sequence determines the three-dimensional structure of a protein. However, the factors that determine whether the protein structure is a monomer or an oligomer are unclear. Domain swapping is a phenomenon in which the partial structure of a monomeric protein exchanges between molecules to form an oligomeric structure. It has been thought that domain swapping can occur in various natural monomeric proteins. In this research project, we aimed to develop domain swapping as a methodology for constructing oligomeric proteins. Here we have found that mutations to the hinge region increase the thermodynamic stability of the protein, resulting in enhancing the oligomer formation. Additionally, we have constructed metal-binding sites on the oligomeric domain-swapped protein using its molecular symmetry.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：ドメインスワッピング 多量体構造 ヘムタンパク質 タンパク質工学 熱安定性 金属結合部位

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

天然では、タンパク質や核酸、脂質分子などが同種・異種分子間で自己集合してナノスケールの高次分子複合体を形成し、単分子には見られないユニークな機能を発現している。例えば、様々な分子を内包可能なケージ状構造を形成するフェリチンやウィルスカプシド、細胞の骨格などを形成するコラーゲンやアクチンなどが挙げられる(図1左)。近年、タンパク質の分子複合体は高い生体適合性や構造柔軟性からドラッグキャリアや骨格分子などの機能性材料としての利用が期待されており、融合タンパク質デザインや有機化学・錯体化学的手法などを用いてナノスケールの様々な構造体が人工的に構築されている(図1右)。

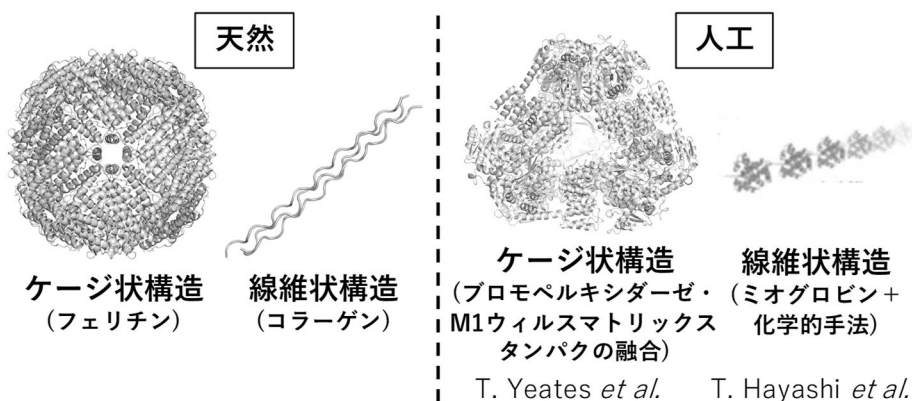


図1 タンパク質が集合して形成する代表的な構造体(左:天然、右:人工)

研究開始当初、タンパク質の立体構造、特に単量体に関しては機械学習や分子シミュレーションなどの計算機を利用した構造予測の試みや構造設計手法が発展しつつあった。一方で、現時点においても上述のようなタンパク質の高次分子複合体を自由にデザインするには至っておらず、タンパク質における高次構造の構築原理についての知見の集積が必要な状況である。研究代表者らは天然で高次構造をもつタンパク質の中にも見られるドメインスワッピングに着目し、ドメインスワッピングを利用した高次分子複合体の構築法の発展に取り組んでいる。ドメインスワッピングとは、単量体の部分構造を分子間で置き換えて構造交換することにより二量体や三量体、さらに高次の多量体も形成する現象である。一般に、ドメインスワップ多量体の単位構造はヒンジ領域(構造交換領域を繋ぐ領域)を除いて単量体と類似しており、そのためにドメインスワップした多量体でも単量体における機能をもつことが多い。これまでに Protein Data Bank に登録されたドメインスワップタンパク質の構造は 300 を超えており、年々増加している。研究代表者はこれまでにドメインスワッピングにより、シトクロム *c* が環状の 3 量体やポリマー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2010))、シトクロム *b*₅₆₂ 変異体やシトクロム *c*₅₅₅ 変異体がケージ状の 6 量体(Chem. Sci. (2015))や 12 量体(Chem. Asian J. (2018))などの高次分子複合体構造をとることを見出してきた(図2)。

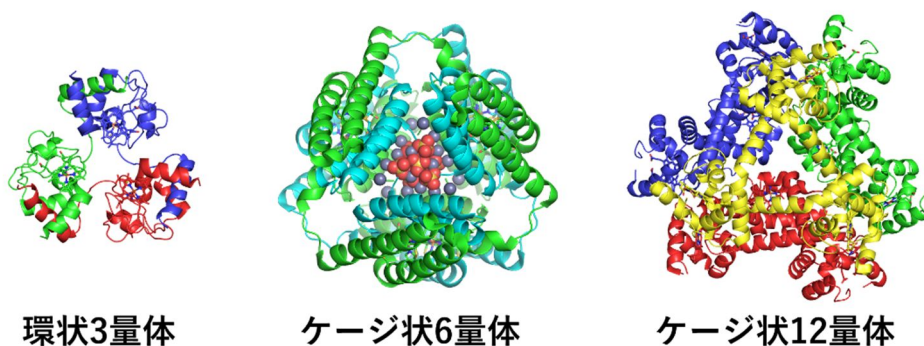


図2 ドメインスワッピングにより形成した高次分子複合体
(左:シトクロム *c*、中央:シトクロム *b*₅₆₂ 変異体、右:シトクロム *c*₅₅₅ 変異体)

研究代表者らは酸素貯蔵を機能とする単量体ヘムタンパク質のミオグロビンもエタノール添加後に凍結乾燥を行うことで様々な大きさの多量体を形成させることが出来、その中で 2 量体の構造がドメインスワップしたものであることを明らかにしている(Dalton Trans. (2012))。ミオ

グロビンのドメインスワップ 2 量体ではヘム活性部位を形成しているいわゆる E ヘリックスと F ヘリックスが分子間で交換した構造となっており、単量体では EF ループであった部分が二量体では E および F ヘリックスと繋がった長いヘリックス構造へと変換されていた (図 3)。この EF ループがミオグロビンにおけるヒンジ領域となる。

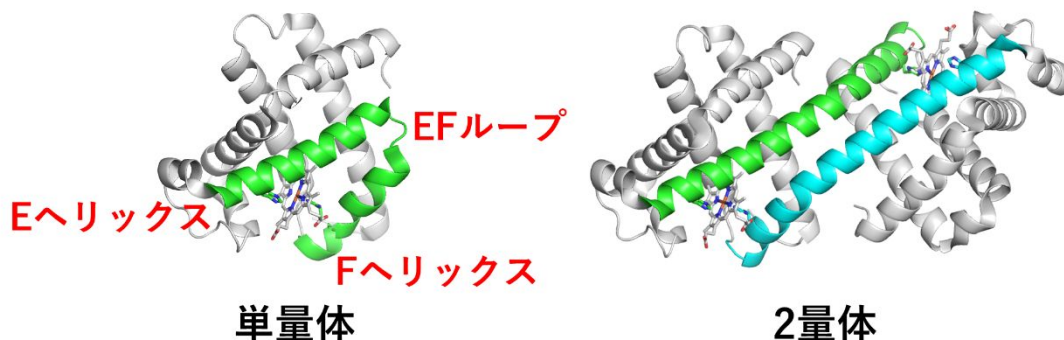


図 3 ミオグロビンの単量体と 2 量体の構造。色付きの領域は E ヘリックス、EF ループ、F ヘリックス。

ドメインスワッピングは単量体タンパク質において起こる普遍的な現象であるが、一般的には形成される多量体はタンパク質のリフォールディング過程において速度論的に形成される準安定状態であることが多い。野生型のミオグロビンにおける二量体も同様で、加熱により最終的には最安定状態である単量体へと解離する。そこで、単量体よりも安定なドメインスワップ構造を作り出せば、安定な高次分子複合体の設計に必要な知見が得られると考えた。まず、私達はミオグロビンがドメインスワッピングにより 2 量化すると EF ループがヘリックスになるという二次構造変換に着目し、EF ループのアミノ酸残基のヘリックス形成能とドメインスワッピング傾向に相関があると推測した。さらに、2 量体が熱安定化されれば、EF ループからヘリックスに変換される領域のアミノ酸側鎖の配向が定まり、アミノ酸側鎖を配位子とした金属結合部位の構築が可能になると考えた。

2. 研究の目的

上述の通り、タンパク質の高次分子複合体を自在に設計するためには、高次構造の構築原理をより深く知る必要がある。ドメインスワッピングでは様々な高次構造体が形成されることから、より安定な高次構造体が得られれば、高次分子複合体の構築原理の理解に繋がる。本研究課題ではミオグロビンのドメインスワップ二量体をモデルとして、ドメインスワッピングにおけるヒンジ領域 (単量体における EF ループ) のヘリックス形成能とドメインスワッピング傾向、すなわち多量体形成能との相関を明らかにした。また、高い熱安定性を有する二量体の構造を基盤として、ドメインスワップ構造の高い対称性を利用したミオグロビンへの金属結合部位導入について検討を行った。

3. 研究の方法

ミオグロビンは大腸菌発現系を用いて野生型 (ウマミオグロビン) および変異型の作製を行った。ミオグロビンの EF ループに相当する 77 番目から 82 番目のアミノ酸配列は KKKGHH であり、これらのアミノ酸残基のうちヘリックス形成能が低いアミノ酸を高いアミノ酸へと変異させ、二量体の形成能、構造、熱安定性について調べた。アミノ酸のヘリックス形成能については W.F. DeGrado や B. W. Matthews らによるペプチドやモデルタンパク質を用いた系統的な実験により調べられており、その知見を参考にした。例えば、プロリンを除くアミノ酸のヘリックス形成能はグリシンが最も低く、ヒスチジンは比較的 low、リシンは比較的高く、アラニンが最も高い。そこで、ミオグロビンの 80 番目のグリシン (KKKGHH の G に相当) をアラニンに変異させた G80A 変異体と、81 番目と 82 番目のヒスチジン (KKKGHH の HH に相当) もアラニンに変異させた G80A/H81A/H82A 変異体を使用した。また、ミオグロビンへの金属結合部位導入については分子の溶媒に露出している 78 番目のリシン (KKKGHH の 2 番目の K に相当) をヒスチジンに変異させた K78H/G80A/H82A 変異体と、分子内部に位置する 79 番目のリシン (KKKGHH の 3 番目の K に相当) をヒスチジンに変異させた K79H/G80A/H81A 変異体を使用し、それらの金属結合性と金属の配位構造の違いを調べた。

4. 研究成果

ミオグロビンの二量体形成能はゲルろ過カラムクロマトグラフィーで、構造は吸収スペクト

ルおよび X 線結晶構造解析で、熱安定性は示差走査熱量 (DSC) 測定で調べた。まず、大腸菌から得られたミオグロビン溶液をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで精製すると、野生型では単量体として得られたが、G80A 変異体と G80A/H81A/H82A 変異体ではそれぞれ約 3 割、約 9 割が 2 量体として得られた。単量体と 2 量体の熱平衡状態における割合は、G80A 変異体で約 1 : 1、G80A/H81A/H82A 変異体では約 1 : 4 となり、単量体/2 量体の比から求められる単量体と 2 量体のギブス自由エネルギー差 ($G_{\text{monomer-dimer}}$) はそれぞれ -6.4 ± 0.1 、 -8.4 ± 0.1 kcal/mol であった。さらに DSC 測定より、G80A 変異体と G80A/H81A/H82A 変異体は二量体から変性が始まり、それぞれの変性温度は野生型の二量体の単量体解離温度 (68) よりも 7 および 10 高かった。これらの結果は、80 番目のアミノ酸を 1 つグリシンからアラニンに変えるとミオグロビンは 2 量体が安定となり、3 つアラニンに変えるとさらに 2 量体が安定化されることを示している。2 量体の吸収スペクトルは野生型と変異体でほぼ違いは無く、アミノ酸変異による活性部位構造への影響は無いと考えられた。これは X 線結晶構造においても野生型と変異型で立体構造に大きな違いが無かったことと一致している。X 線結晶構造では、変異を導入したアミノ酸の側鎖は周りのアミノ酸との相互作用は見られなかったことから、変異型における 2 量体の安定化はアミノ酸側鎖間の相互作用によるものではなく変異による二次構造の安定化に起因すると考えられた (Chem. Asian J. (2020))。

次に、80 から 82 番目のアミノ酸をアラニン変異すると 2 量体が安定化されることから、EF ループのアミノ酸を 2 つをアラニンに、1 つを金属結合部位としてリシンに変異させた K78H/G80A/H82A 変異体と K79H/G80A/H81A 変異体は大腸菌から精製した。どちらの変異体も多くの 2 量体が形成し、それらの結晶構造は野生型や G80A 変異体、G80A/H81A/H82A 変異体と類似していることが明らかとなった。2 つの変異体の結晶を Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} の金属イオンを含む結晶化溶液でソーキングして構造解析した結果、K78H/G80A/H82A 変異体では Co と Ni、K79H/G80A/H81A 変異体では Co と Zn がそれぞれ変異導入したヒスチジンと結合していた (図 4)。

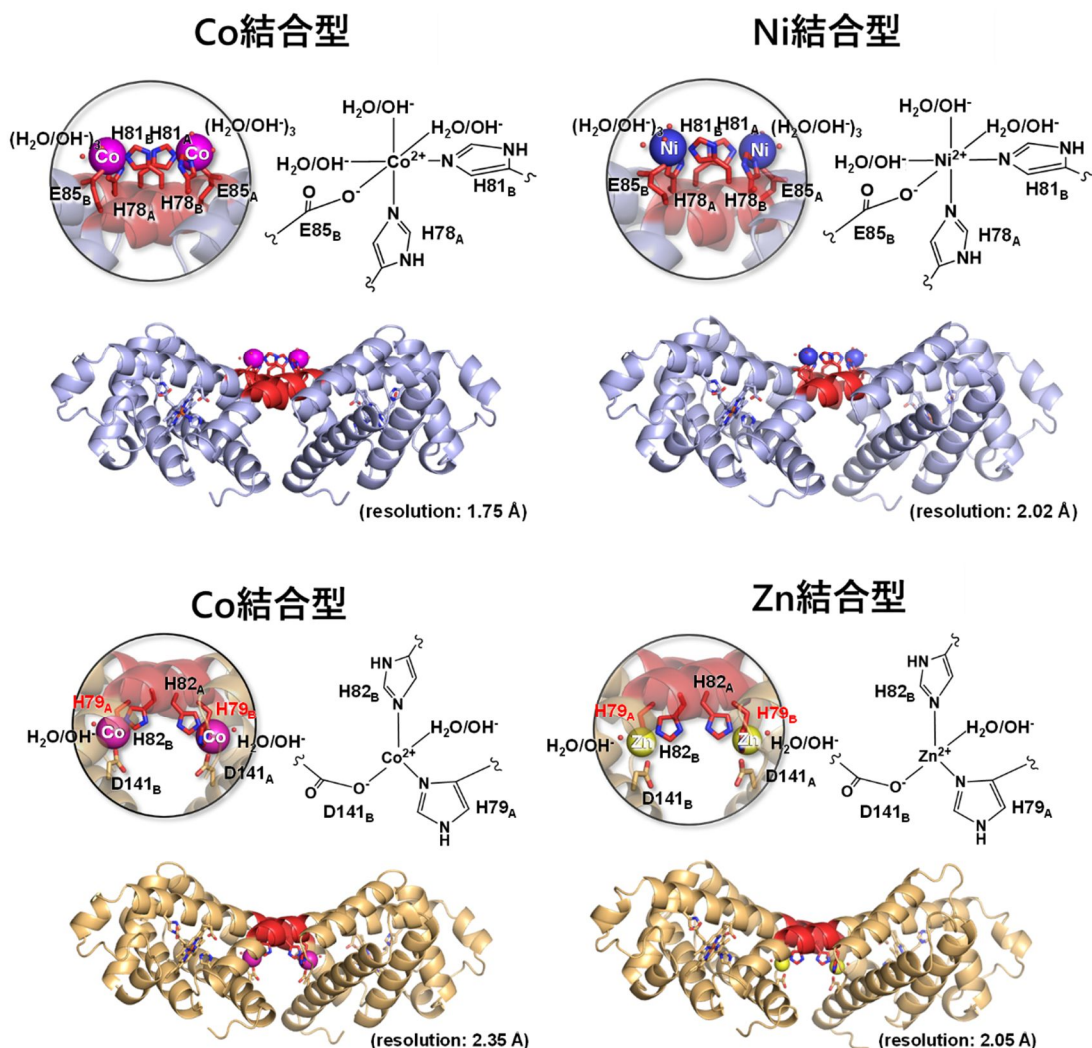


図 4 K78H/G80A/H82A 変異体 (上段) と K79H/G80A/H81A 変異体 (下段) の金属結合型 2 量体構造。構造式は変異導入したヒスチジンと結合した金属の配位構造を示している。

興味深いことに2つの変異体では結合する金属に違いがある一方で、Coはどちらの変異体においても結合が見られ、その配位構造はK78H/G80A/H82A変異体では八面体型6配位構造、K79H/G80A/H81A変異体では四面体型4配位構造と異なっていた。このCoの4配位構造はスーパーオキシドリダクターゼやカルボニックアンヒドラーゼなどの金属酵素の金属置換体に限られた珍しい配位構造で、79番目のヒスチジンが分子内部に存在することによって特異な配位環境を形成していると考えられる(J. Inorg. Biochem. (2021))。

以上の結果より、ミオグロビンのEFループにヘリックス形成能の高いアミノ酸を変異導入することで2量体構造が安定化され、ドメインスワッピングが促進されることが明らかとなった。さらに、安定化された2量体構造にヒスチジンを1つ導入すると、金属結合部位が構築可能であり、ヒスチジンを導入する位置によってその金属結合性が異なることが明らかとなった。これらの知見は、ドメインスワッピングにおいてヒンジ領域の二次構造の安定性が多量体形成能に重要であることを示しており、高次分子複合体の設計に寄与すると考えられる。また、ドメインスワップ構造の分子対称性を利用して金属結合部位を構築することが可能であり、高次分子複合体に金属酵素のような機能性を付与する際の手法の1つとなると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagao Satoshi, Suda Ayaka, Kobayashi Hisashi, Shibata Naoki, Higuchi Yoshiki, Hirota Shun	4. 巻 15
2. 論文標題 Thermodynamic Control of Domain Swapping by Modulating the Helical Propensity in the Hinge Region of Myoglobin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry - An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 1743 ~ 1749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.202000307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagao Satoshi, Idomoto Ayaka, Shibata Naoki, Higuchi Yoshiki, Hirota Shun	4. 巻 217
2. 論文標題 Rational design of metal-binding sites in domain-swapped myoglobin dimers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 111374 ~ 111374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2021.111374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Majumder Rini, Roy Snigdha, Okamoto Kentaro, Nagao Satoshi, Matsuo Takashi, Parui Partha Pratim	4. 巻 36
2. 論文標題 Porphyrin-Based Probe for Simultaneous Detection of Interface Acidity and Polarity during Lipid-Phase Transition of Vesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 426 ~ 434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.9b02781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Xie Cheng, Shimoyama Hiromitsu, Yamanaka Masaru, Nagao Satoshi, Komori Hirofumi, Shibata Naoki, Higuchi Yoshiki, Shigeta Yasuteru, Hirota Shun	4. 巻 11
2. 論文標題 Experimental and theoretical study on converting myoglobin into a stable domain-swapped dimer by utilizing a tight hydrogen bond network at the hinge region	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 37604 ~ 37611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1ra06888a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長尾聡、井戸本彩花、須田綾香、小林紀、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊
2. 発表標題 タンパク質超分子構築のためのドメインスワッピングにおけるヒンジ領域のアミノ酸配列設計
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井戸本彩花、長尾聡、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊
2. 発表標題 金属結合部位を有するドメインスワップしたミオグロビン2量体のデザインと性質
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井戸本彩花、長尾聡、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊
2. 発表標題 金属結合部位を導入したドメインスワップミオグロビン2量体の構造と性質
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井戸本彩花、長尾聡、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊
2. 発表標題 ドメインスワッピングを利用したミオグロビンへの金属結合部位の導入
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長尾聡、井戸本彩花、須田綾香、小林紀、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊
2. 発表標題 ミオグロビンにおける安定性向上および金属結合性付与ドメインスワップ二量体の分子設計
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	廣田 俊 (Hirota Shun)		
研究協力者	須田 綾香 (Suda Ayaka)		
研究協力者	井戸本 彩花 (Idomoto Ayaka)		
研究協力者	小林 紀 (Kobayashi Hisashi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------