

自由エネルギー地形計算に基づく蛋白質のモデル構造データベースの構築と応用

●中村 春木 ◆中島 伸介

大阪大学蛋白質研究所

〈研究の目的と進め方〉

ゲノム情報から対応する蛋白質の立体構造情報を抽出し、その立体構造に基づく生化学的機能の理解が求められている。蛋白質ファミリー代表の立体構造から、相同性の低い部位やフレキシブルな部位の立体構造モデリングを行うことは、本質的に困難である。本研究の研究代表者である中村らによって開発された、構造サンプリングによる分子構造の自由エネルギー地形を描く新しいシミュレーション手法によって、これら部分構造の信頼性の高いモデルを作成することが目的である。一方、分子表面の形状と物性の見地から蛋白質の分類・整理することにより、蛋白質の構造と分子機能への関連付けをすることが、もう一つの目的である。

構造サンプリングによる演繹的なモデリング手法の開発を行う一方、同時に分子表面の形状と物性の見地から蛋白質の分類・整理したデータベースを構築し、最終的に両者を統合したデータベースを作成する。

〈研究開始時の研究計画〉

1. 高い相同性領域に対するホモロジー・モデリング・システムの作成：対象となる蛋白質のアミノ酸配列を、PSI-BLAST等を利用して、立体構造既知の蛋白質を含む複数の蛋白質と伴にマルチプル・アライメントを行い、相同性の高い領域に対して、従来個別に開発してきたdistance geometry計算法と側鎖パッキング最適探索法(DEE法)を組み合わせて、立体構造モデリング・システムを作成する。
2. 効率的構造探索アルゴリズムの並列化プログラムの作成と実行：残された相同性が低い領域に対しては、その両端の主鎖位置に制限をかけながら、溶媒を含めた系での効率的構造探索計算を行う。具体的には、マルチカノニカル分子動力学シミュレーションを行い、室温での正しいカノニカル・アンサンブルを再現する。結果として得られるモデルは単一ではなく室温で取りうる確率が高い構造のアンサンブルとなるが、この構造アンサンブルをクラスター解析し、その中心的な構造を一つの代表構造としても提示する。

〈研究期間の成果〉

開発したホモロジーモデリング・システムによって、ムコ多糖症における遺伝子疾患を蛋白質立体構造から考察した[1]。

構造サンプリングによる演繹的なモデリング手法の開発を進めた。計算結果を大きく左右するポテンシャル関数に対して、ペプチドフラグメントに対する実験との対比を行い、力場の有効性を考察するとともに、ab initio量子化学計算による補正手法を提案した。その結果、10残基程度の長いペプチド・フラグメントに対し、実験と一致する自由エネルギー地形を描くことができた。特に、用いる力場パラメータの依存性が極めて大きいことを示した[2]。

一方、蛋白質の分子表面電位、疎水性・親水性等にも対応づけられた表面形状をカラーで図示し、electrostatic-surface of Functional site (eF-site)と呼ぶデータベースを作成し、インターネット上で公開した[3]。描かれたeF-siteの表面図形を客観的に識別し、表面の分類を行うため、分子表面の高速識別手法として、グラフ理論を基にしたクリーク探索手法を用いて解析する手法を開発し、活性部位を異なるフォールド上で認識できるようになった。

平成13年度以降は、申請条件の変更により班友という立場で研究を継続した。

平成13年度以降には、見えないループの前後2残基(合わせて4残基)の重ね合わせ後のrmsdが小さなループ、上位100個に対して、DEE法を利用し、可能な側鎖のロータマー状態の検索を行いながら最適な主鎖構造を検索する方法を開発した。その結果、5残基程度までの短いループならばデータベース検索だけでも、ほぼ正しいループ構造を構築することができた。

一方、より長いループに関しては、平成12年度に開発したMcMD法による構造サンプリングが効果的であるため、まず、懸案となっていたパラメータの自動的決定法をその後に開発し(Force-Biased McMD (FBMcMD)法)、リアルな水分子の代わりにGeneralized Born法による溶媒効果の取込みを行って、高速計算を実施できるように高度化した。これらの進展に基づき、アポ体の結晶構造ではflexibleすぎて電子密度が見えていない部分に対して、可能なループの構造モデルアンサンブルを構築し、リガンド結合時の結晶構造が含まれていることを示すことができた。このように、構造サンプリングによる演繹的なモデリング手法は、リガンド結合によって構造変化を起こす場合に対しても有効であることが確認できた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

eF-siteについては、Curr. Opin. Str. Bio.誌等でも紹介され、蛋白質機能部位のデータベースとして広く利用されている。ループ構造をMcMD法でモデル化する手法は、その後、JBIRCにおいてprestoXとしてシステム化され、一般に普及されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

科学研究費のしくみの変更による重複申請禁止措置に伴い、平成12年度のみの研究となり、本特定領域研究における活動を最終年度まで継続することができなかった。

〈今後の課題〉

蛋白質立体構造上にて観測されていないループの網羅的なモデル構造データベースを公開する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- [1] 0602041913: Sukegawa, K., Nakamura, H., Kato, Z., Tomatsu, S., Montano, A. M., Fukao, T., Toietta, G., Tortora, P., Orii, T., and Kondo, N., Biochemical and

structural analysis of missense mutations in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase causing mucopolysaccharidosis IVA phenotypes, *Human Mol. Genet.*, 9(9), 1283-1290, 2000.

[2] 0602041917: Ono, S., Nakajima, N., Higo, J., and Nakamura, H., Peptide free energy profile is strongly dependent on the force field: Comparison of C96 and AMBER95, *J. Comput. Chem.*, 21(9), 748-762, 2000.

[3] 0602041920: eF-site, <http://ef-site.hgc.jp/eF-site/>