

実験データに基づく蛋白質立体構造評価システム

●高野 和文

大阪大学大学院工学研究科

<研究の目的と進め方>

本研究は、最近研究代表者が中心となり系統的な蛋白質構造物性に関する実験データを基に世界に先駆けて初めて体系化に成功した「アミノ酸安定性スケール」を用いて、遺伝情報からモデリングされた蛋白質構造、及び、遺伝子の機能改良・改変においてデザインされた蛋白質構造に関して、(1) それらを総合的に評価するシステムの構築、(2) 構築されたシステムの実験的検証、(3) 構築されたシステムの応用・実用化を行い、今後のゲノム情報科学の発展に応えようとするものである。具体的には、[1] モデル・デザインされた構造を評価する理論体系を確立する。[2] それを基に、計算機で容易に評価できるソフトウェアを開発する。[3] 作製したソフトウェアをより高性能なものにするために、検証を繰り返す。[4] 完成した評価システムを用いて自ら具体的な実用例・応用例を提示する。

研究代表者はこれまで、蛋白質立体構造の構築原理を解明するための基礎課題として、立体構造の安定化機構を実験的に明らかにしていくことを行ってきた。そこでは、系統的・網羅的な変異蛋白質を作製し、その安定性測定および構造解析を通して、安定化に関与する因子の寄与を定量的に抽出することを目指した。当研究により、ヒトリゾチームの約 150 種の変異体について、その変性の熱力学的パラメータと結晶構造を決定した。それらのデータを詳細に解析することにより、安定性変化と構造変化の相関関係を明らかにすることができた。それは、疎水性相互作用の寄与などだけでなく、二次構造の傾向性の効果なども含むこれまでにない新規な解釈であった。またそれは、他の蛋白質にも適用することができ、普遍的なものであることも示した。さらに、蛋白質分子内部に位置する水分子の安定化の寄与も世界で初めて実験的に評価することができた。これらの結果は、このような研究方法により蛋白質の安定化に関与する因子の寄与を算出することができることも示している。当研究により、安定化に関与する因子として、水素結合、イオン結合、分子内親水基、分子表面水和、二次構造傾向性、側鎖エントロピーなどを抽出することができ、またそれらの安定化への寄与を算出した。さらにそれらを統一的に評価する一般式を確立することができた。主鎖構造・二次構造に関しては、左巻き二面角構造における構造柔軟性と安定性の関係、二次構造の環境による変化 (α ヘリックス $\rightarrow\beta$ シート) に関与する因子の抽出などを示した。当研究成果は計 26 報の論文、3 報の総説に発表されている。

さらに、当研究はリボヌクレアーゼ Sa を用いて行った。そこでは、水素結合、分子内親水基に焦点を絞り、それらの安定化への寄与を調べた。その結果は我々が得ていた結果と同じであり、一般則の確立に大いに役立てられた。

上記のように、これまでの系統的な安定性研究により、様々な安定化因子の寄与を算出することができ、また安定性評価を統一的に表すことができる一般式を構築した。さらにそれらを用いて「アミノ酸安定性スケール」を世界に先駆けて初めて体系化に成功した。これは、蛋白質の構造安定化に寄与する様々な環境下に

おける各アミノ酸の寄与を蛋白質実験データに基づいて算出したものである。

<研究開始時の研究計画>

(1) 評価システムの改良・完成

これまでの実験的検証結果を基に、本評価システムを改良する。改良を進めることで、好熱菌由来の蛋白質の安定化機構の解明にも取り組む。また、これらにより完成した本評価システムの暫定版を用いて、他の研究者にモデル・デザイン構造を評価してもらうために使っていただく。これらの結果を基に、最終的なシステムを構築する。構築されたソフトウェアは、Web 上で公開を目指す。

(2) 評価システムの応用

本評価システムは、モデル構造などの評価に役立つばかりでなく、様々な応用的利用も可能である。利用例として、蛋白質の安定化、機能部位予測、さらに分子認識機構などへの展開などがある。これらの応用実験に関しては、本研究ではそれらについて自ら実験を行い、実例を提示する。対象とする蛋白質はこれまで良く実験されてきたモデル蛋白質を用いる。

<研究期間の成果>

(1) 評価システムの改良・完成

本プログラムの作製にあたり、ASA 計算、Cavity 計算、水素結合検出、水分子検出を行うソフトの開発が必要である。さらにそれらの開発したソフトと、二次構造傾向性の値、側鎖エントロピーの値を加えまとめたプログラムを作製することが必要となっている。現在までのところ、ASA 計算：既存のプログラム転用、Cavity 計算：プログラム開発済、水素結合検出：プログラム作製済、水分子検出：プログラム作製済、二次構造傾向性の値：文献値利用、側鎖エントロピーの値：文献値利用となっており、個別のソフトは完成した。個々のソフトを用いることで、これまで手計算で行っていた本システム計算が簡便なものとなった。今後はこれらをまとめたプログラムの作製を行う必要がある。

(2) 評価システムの応用

構造評価プログラムの検証を行うため、超好熱菌由来の安定な蛋白質の安定性実験を進めた。超好熱菌 RNaseHIII の野生型と疎水性残基の変異型を作製し、その安定性を測定した。その結果、全ての変異体の安定性が減少していることがわかった。この減少の原因は本システムを用いて検証した結果、変異により作製された Cavity 量の大きさに依存することがわかった。このことは、本システムの有効性を示している。

<国内外での成果の位置づけ>

モデリングされた蛋白質や変異蛋白質の安定性や構造評価に関する要望は多く、本システムの完成を早急に行う必要がある。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

大方予定通りに進行しているが、プログラムの開発において、全体をまとめたプログラムの開発までは至らなかった。原因としては、個々のソフトの開発に時間を要したことと、それぞれ別々の形態で動作する仕組みとなっていることによる。そのため、他の研究者に使用してもらうことには至らなかった。

<今後の課題、展望>

本システムの完成と完成した評価システムを用いて自ら具体的な実用例・応用例を提示すること、および、他の研究者に使用してもらうことである。

<研究期間の全成果公表リスト>

なし。