

機関番号：84420

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700321

研究課題名（和文）生体内でのタンパク質四次構造によるリガンド認識に関する研究

研究課題名（英文）Ligand binding sites on the surface of protein quaternary structures

研究代表者

森田 瑞樹（MORITA MIZUKI）

独立行政法人 医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：00519316

研究成果の概要（和文）：

タンパク質とリガンドとの相互作用は生体中のさまざまな現象を担っている。本研究で目指していることは、タンパク質におけるリガンド結合部位は進化の過程でどのようにして選択されてきたのかを明らかにすることである。タンパク質のリガンド結合部位が生体内の四次構造中においてどのような場所に生じているのかを解析し、そのことと立体構造上の特徴、ダイナミクス、機能のそれぞれとの関係を解析した。

研究成果の概要（英文）：

Protein-ligand interaction is a basic process underlying diverse biological phenomena. The ultimate goal of this project is to reveal how the location of ligand binding sites on protein surface have been selected in the course of evolution. We have developed a dataset of protein quaternary structures with ligands. We then have taken the statistics of the location of ligand binding sites, and have analyzed the relationships between the location and geometric feature of the ligand binding site, protein dynamics and protein function, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：タンパク質による分子認識

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質-リガンド間相互作用は多くの生命現象を担う基本的な分子反応である。また、これまでに市販された医薬品の大半はタンパク質-リガンド間相互作用に関わるものであることが知られている。

近年このタンパク質-リガンド間相互作用の立体構造に焦点を当てた体系的な研究が

複数報告されている。しかしながら、それらはすべてタンパク質の生体内での四次構造を考慮に入れない研究であった（図1）。一方で生体内での四次構造を考慮している研究はあるものの、いずれも個々のタンパク質についてのケース・スタディであった。したがって、生体内で起こっているタンパク質四次構造によるリガンド認識についての全体像はこれまで明らかされていない。

タンパク質のX線構造解析の専門家である Petsko と Ringe によると、タンパク質が複数のサブユニットからなる場合にはリガンドはサブユニット同士の間で結合する例が多く見られる (図2)。そのため、従来行われてきたタンパク質の「生体内での四次構造 (BU)」を用いない研究では、タンパク質の構造と機能について不完全または誤った結論を導いてきたと考えられる。

本研究ではBUを用いた大規模解析を行うことによって、生体内でのタンパク質の状態をより正確に反映した解析結果を得ることができ、また従来の研究に潜む誤りの程度を評価することができる。BUのデータを大量に収集したデータセットを構築するためには、大変な労力を要する。これまでに研究代表者はBUの大規模データセットを効率よく作製するための枠組みを構築し、準備を進めてきた。本研究ではこの枠組みを用いて大規模データセットを構築し、解析を行う。

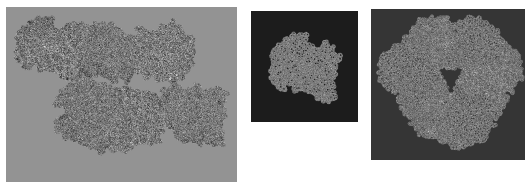


図1 タンパク質の四次構造。左) 結晶中でのタンパク質の四次構造 (ASU), 中) 単量体構造, 右) 生体内での四次構造 (BU)。これらの3つの立体構造が一致しているタンパク質もあるが、このタンパク質のようにそれぞれが異なっているものも少なからずある。そのため、タンパク質の構造と機能の関係について研究を行う場合には、BUを利用する必要がある。

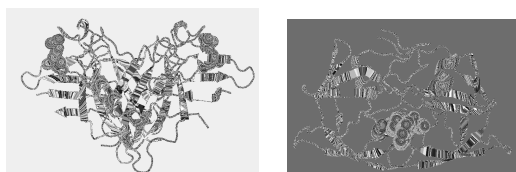


図2 BUにおけるリガンド結合部位の生成場所 (二量体タンパク質を例として)。左) リガンド結合部位はそれぞれのサブユニットに別々に存在する。右) リガンド結合部位は2つのサブユニットにまたがって存在する。右の場合、BUを使わないとリガンド結合部位が正しく形成されない。

## 2. 研究の目的

タンパク質立体構造の表面においてリガ

ンドが結合する部位と結合しない部位との違いとは何か、言い換えると、リガンド結合部位は進化の過程でどのようにして選択されてきたのか。最終的にはこれらの問いに答えることを目指している。

しかしながら、タンパク質-リガンド間相互作用について、タンパク質の生体内での四次構造 (BU) を用いて行われた大規模な研究はこれまでなく、そのためタンパク質-リガンド間相互作用では未だ基礎的なことにおいても不明なことが多い。よって本研究でははじめに大規模なデータセットを構築し、このデータセットからリガンド結合タンパク質のBUについての基礎的な情報を収集する。続いて、タンパク質によるリガンドの認識においてこれまでのBUを用いない研究では知り得なかったこと、およびBUを用いないために誤った結論を導いてきた恐れがあることについて焦点を当て、解析を行う。

具体的には次の4点を本研究における目的とする。

### (1) 大規模データセットの構築：

はじめにタンパク質の生体内での四次構造 (BU) の大規模なデータセットを構築する。リガンド結合タンパク質のBUを用いた研究は未だ手つかずの領域であるが、質の高いデータセットが構築されることで他の研究者が参入してこの研究領域が活性化されることが期待される。

### (2) BUについての基礎的な統計情報の収集：

四次構造が正しくない場合、つまりサブユニットの空間的な位置関係が実際とは異なる場合には、サブユニット同士の間にあるリガンド結合部位は正しく形成されない (図3)。よってこれまでに行われてきたASU (図1左) や分割した単量体 (図1中) を用いた研究から得られた知見は、もし「ASUとBUが異なる」または「BUが多量体」というタンパク質が多い場合には、不正確であることになる。従来研究および本研究の価値を計るために、データセット中にこれらの例が実際にどれくらいの割合で存在するのかを調査する。



図3 BUを利用しないことで正しいリガンド結合部位が形成されない例。左) ASUではリガンド結合部位が一部しか形成されていない。右) BUで

形成されているリガンド結合部位。A S Uや単量体を用いて解析をした場合には、誤った結論を導く恐れがある。

### (3) タンパク質立体構造上のリガンド結合部位の解析：

研究代表者はこれまでに、BUが多量体のタンパク質においてBUを用いないことで結合部位が正しく形成されない場合には、結合部位の予測および特徴抽出をする際に誤った結論を導くことを示した [1]。BUが多量体の場合に複数のサブユニットにまたがって形成されるリガンド結合部位とそれ以外のリガンド結合部位について、物理化学的な性質の差異およびタンパク質の機能とリガンドとの関係について明らかにする。

### (4) リガンドの結合によって引き起こされるタンパク質の構造変化の解析：

リガンドの結合はタンパク質の構造変化を引き起こすことが知られている。これまで構造変化の研究は分割した単量体 (図1中) を用いてなされていた。単量体ではすべてのペプチド鎖が連続しているのに対し、多量体は各サブユニット同士は接続されておらず表面によってのみ接触しており、したがって単量体と多量体では構造変化の大きさと種類 (Hinge, Sheer, Others) には違いが生じると予想される。リガンド結合によって引き起こされるBUの構造変化について、単量体と多量体との違いを明らかにする。

## 3. 研究の方法

タンパク質によるリガンド認識を解析するための有力な方法の1つは、リガンドが結合する前後の立体構造を比較することである (図4)。

本研究ではタンパク質の生体内での四次構造 (BU) とリガンドの相互作用の研究のために、タンパク質-リガンド結合構造と非結合構造をペアにしたデータからなるデータセットを利用する。このデータセットからBUについての基礎的な情報の収集をし、続いてBUを用いないと知り得ないことおよびBUを用いないと誤った結論を導いてしまうことについて焦点を当てて解析をする。研究は以下の計画で進める。

- (1) リガンド結合構造と非結合構造ペアの大規模データセットの構築
- (2) BUについての基礎的な統計情報の収集
- (3) タンパク質立体構造上のリガンド結合部位の解析
- (4) リガンドの結合によるタンパク質の構造変化の解析

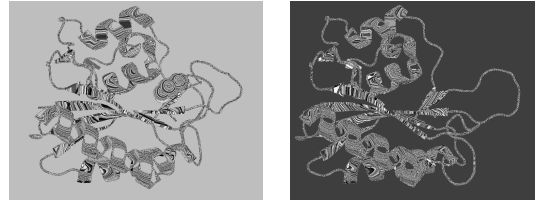


図4 タンパク質のリガンド結合状態と非結合状態。左) リガンドが結合している状態。黒い球がリガンド。右) リガンドが結合していない状態。こうしたペアのデータセットを構築することで、リガンドの結合がタンパク質の立体構造に与える影響を解析することが可能となる。

## 4. 研究成果

本研究では、リガンド結合部位が生じる場所は進化の過程でどのようにして選択されてきたのかを明らかにすることを目指している。本研究の解析に必要なデータセットの構築を行い、このデータセットを用いてリガンド結合部位が生じている場所と、リガンド結合部位のサイズ・ダイナミクス・機能のそれぞれとの関係について解析を行い、以下に示す結果を得た。

### (1) リガンド結合構造と非結合構造ペアの大規模データセットの構築：

はじめに、タンパク質四次構造データセットの構築と、その意義について検討した。

タンパク質のリガンドが結合をした構造と結合をしていない構造のペアを本研究のために開発したWebサーバーから得た。各タンパク質の四次構造情報はPISAサーバーから取得した。人手でチェックを重ね、最終的に126ペア、計252タンパク質の非冗長なデータセットが得られた。ここでPISAサーバーから収集した四次構造のデータは予測されたものであるが、論文から四次構造の情報を得ることができた一部のタンパク質については、9割以上が論文に書かれていた多量体と一致していた。これはPISAサーバーの論文で報告されていた値と一致する。

### (2) BUについての基礎的な統計情報の収集：

構築したデータセットを解析し、四次構造データセットに含まれる多量体の割合、多量体においてリガンド結合部位が生じている場所を解析した。

単量体と多量体の割合はほぼ1対1であり、多量体では約半数のタンパク質においてリガンド結合部位がサブユニットの境界に生じていた。この結果は、タンパク質-リガ

ンド間相互作用の研究において四次構造を考慮することの重要性を示している。

(3) タンパク質立体構造上のリガンド結合部位の解析：

リガンド結合部位についての詳細な解析を行った。

リガンド結合部位が生じている場所は次の3つに分類できる：1) 複数ドメインの間，2) 複数サブユニットの間，3) 1つのサブユニット，1つのドメインの中。複数ドメインからなるタンパク質の場合，リガンド結合部位は1)にある割合が3)と比べて高く，また複数サブユニットからなるタンパク質の場合には2)にある割合が3)と比べて高かった。

つまり，リガンド結合部位は複数のドメインおよびサブユニットの境界に生じやすいことが分かった。

(4) リガンドの結合によるタンパク質の構造変化の解析：

結合部位のサイズおよびダイナミクスとの関係では，1)と2)では3)よりもリガンド結合部位のサイズが大きく，またリガンド結合に伴う結合部位のサイズの変化が大きいことが分かった。一方で機能について調べると，転移酵素においては3)の割合が低く，逆に加水分解酵素においては3)の割合が高いことがわかった。

つまり，リガンド結合部位が生じる場所はタンパク質の機能によって影響を受けていることが明らかになった。またそれは，リガンド結合部位のサイズやダイナミクスの違いに関係があるものと考えられる。

[1] M Morita, S Nakamura, K Shimizu. *Proteins*, **73**, 468-479 (2008)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. M. Morita, T. Terada, S. Nakamura, K. Shimizu. BUDDY-system: A web site for constructing a dataset of protein pairs between ligand-bound and unbound states. *BMC Res Notes*, 4, 143 (2011) (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

1. 森田 瑞樹，タンパク質のリガンド結合部位と四次構造，第4回京阪奈計算生物物理学セミナー，2011年3月18日，医薬基盤研究所
2. 森田 瑞樹，タンパク質の機能とダイ

ナミクスと四次構造，第2回超分子組織体シンポジウム，2010年10月31日，ホテル水葉亭

3. H. Ikezawa, Development of protein-ligand complex's database considering biological units, The 47th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2009. 10. 30, Tokushima Bunri University

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 瑞樹 (MORITA Mizuki)

独立行政法人 医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・特任研究員

研究者番号：00519316

(2) 研究協力者

池澤 弘貴 (IKEZAWA Hiroki)

東京大学 大学院農学生命科学研究科・大学院生

研究者番号：