

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：平成 20 年～平成 22 年

課題番号：20370063

研究課題名（和文）タンパク質立体構造情報からの基質結合→構造変化の因果関係を明らかにする

研究課題名（英文） Identification of the relationship between protein structural changes and ligand binding on the basis of 3D protein structures

研究代表者 木寺 詔紀 (KIDERA AKINORI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：00186280

研究成果の概要（和文）：タンパク質立体構造の線形応答理論において、基質結合による構造変化は基質結合という摂動に対する応答として捉えられ、この理論は多くの協同的構造変化を予測することができる。この方法の精度を上げるために、理論をデカルト座標系から二面角内部座標系に拡張した。さらに、弾性ネットワークモデルによる応答関数を線形応答理論に適用する方法を開発することで、データベース中のタンパク質について網羅的に理論を適用することを可能とし、基質結合と構造変化の因果関係についてのデータベース解析を行うことができた。

研究成果の概要（英文）：Protein structural changes are described based on the linear response theory as a response to the perturbation such as ligand binding. This theory succeeded to predict various cooperative structural changes upon ligand binding. First, to improve the accuracy of the prediction, we have extended the theory in terms of the Cartesian coordinates to the one in the dihedral angles. Then, by developing the method calculating the response function in the linear response theory by the elastic network model, we can exhaustively apply the theory to numerous protein structures in the database. Using this method, we successfully carried out the database analysis of the causal relationship between protein structural changes and ligand binding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：構造・機能予測、タンパク質ダイナミクス

1. 研究開始当初の背景

一般的にタンパク質機能は、「基質分子などとの結合によって引き起こされる立体構造変化とそれに伴う化学反応」と言うことができる。そのような立場に立つとき、タンパク質の分子機能を理解することは、結合→構造変化、構造変化→反応（反応場の形成）という現象の原因と結果の因果関係を明らか

にすること、と言い換えることができるだろう。以下では便宜的に、タンパク質と分子間相互作用をする物質すべて（低分子化合物、タンパク質、核酸など）を基質と呼ぶこととする。

このような認識のもと、我々はこれまでに基質結合と構造変化の因果関係を記述する一般的な理論であるタンパク質構造変化の

線形応答理論を提案している。その理論は、最もわかりやすい形に近似すれば、

$$\langle \Delta \mathbf{r} \rangle_i = \frac{1}{k_B T} \langle \Delta \mathbf{r} \Delta \mathbf{r} \rangle_0 \cdot \mathbf{f}_r$$

という形をとる。これは単純な静的線形応答関係を記述するもので、右辺の基質からの相互作用力 \mathbf{f}_r が系にかかったときに、非結合状態における平衡ゆらぎの共分散行列 $\langle \Delta \mathbf{r} \Delta \mathbf{r} \rangle_0$ に比例して、左辺の基質結合によるタンパク質の座標値の変化 $\langle \Delta \mathbf{r} \rangle_i$ が求まるというものである。これによって、右辺の原因である相互作用 \mathbf{f}_r と左辺の結果である構造変化 $\langle \Delta \mathbf{r} \rangle_i$ を接続する因果関係を簡潔に表現することができる。

これまで、分子動力学シミュレーションによって求めた基質非結合状態の平衡ゆらぎの共分散行列 $\langle \Delta \mathbf{r} \Delta \mathbf{r} \rangle_0$ を用いて、多数のタンパク質-低分子基質複合体について、この理論が結晶構造に見られる基質結合→構造変化の因果関係を再現できることを示してきた。この方法をデータベース中の構造変化について網羅的に適用するためには、少ない計算量で近似的に共分散行列を計算することができる「弾性ネットワークモデル」(粗視化された基準振動解析法)を用いる必要がある。これまでに、弾性ネットワークモデルは、主鎖の大規模運動に関する限り、分子動力学シミュレーションと大差ない結果を与えることを確認している。ここに、線形応答理論によるタンパク質構造変化の網羅的解析の可能性が見えてきた。これまでの低分子物質との複合体についての予備的な解析の結果によれば、大規模な構造変化をするものの約 2/3 が上記の線形応答理論で説明可能であることが分かっている。本研究課題の提案は、この線形応答理論を基本的な枠組みとして、基質結合→構造変化の因果関係の一般的な論理(ルール)を同定しようとするものである。

2. 研究の目的

立体構造データベース(PDB)から、ひとつのタンパク質で基質結合状態と非結合状態の両方を持つものを集積し、相同性等の重複を除いた2次データベースを構築する。それを用いて以下を明らかにする。構造変化は、タンパク質全体のドメイン運動を含むものと、局所的なループ、側鎖構造のみを変化させるものに大別される。まず最初に、それらの中に多く、構造変化部位が基質結合部位とかけ離れたところにあり、結晶場の変化を原因とする構造変化と思われる例が相当数あり、それらを機能的運動でないとして区別しておく必要がある。基質結合が原因であるときに、上記の線形応答理論が成立する線形的な構造変化と、結合に際して局所的なフォールディング/アンフォ

ールディングを伴う(典型的にはディスオーダー領域の結合に伴う構造形成)非線形的な構造変化をするものに分類する。これらの分類結果に対して、機能発現機構との相関を明らかにする立場から、基質結合場(基質結合残基の空間配置)、酵素反応場(反応に関与する残基の空間配置)がどのように構造変化に伴って形成されるかを個別タンパク質機能と関わる形で整理する。最終的には、基質結合→構造変化の因果関係を線形応答理論に基づいて理解するために、その理論が要求する情報(平衡ゆらぎ、基質結合位置)を基質非結合状態の構造のみから与える枠組みを作る。

3. 研究の方法

ここで用いる方法は、タンパク質立体構造変化の線形応答理論の拡張とそれに伴うデータベース解析である。

3.1 二面角系線形応答理論

二面角系線形応答理論は単純には、

$$\langle \Delta \theta \rangle_i = \frac{1}{k_B T} \langle \Delta \theta \Delta \theta \rangle_0 \cdot \mathbf{f}_\theta$$

となるが、この振る舞いは極めて悪いことが予想されている。そのときに、どのような問題解決策があり得るのかが課題となる。また、その問題が解決したときには、二面角系ダイナミクスの本質的な問題を解く端緒が得られることになり、そこからの展開があり得る。

3.2 弾性ネットワークモデル

タンパク質立体構造変化の線形応答理論は、基質結合の影響を外力によって表現する。その際に、加えた外力に対する反作用を露わに考慮する必要から、運動を相対運動にして、動かない部分を足場にして動かす部分に力を加える。その場合に、応答関数である共分散行列は、動かない部分の外部運動を取り除く必要があるが、弾性ネットワークモデルはそのままの形では、重心まわりの外部運動が除かれた Eckart frame になる。そこで課題は、任意の non-Eckart frame における弾性ネットワークモデルの構築である。

3.3 データベース解析

データベースの構築では、PDB からリガンド結合状態と非結合状態の両方で結晶構造が解かれたエントリーを抽出するのだが、リガンドはこの場合低分子化合物に限り、結晶化剤などを除く必要がある。さらに、結晶中の会合状態、冗長性を防ぐための配列相同性、missing atom の同定、等を考慮する必要がある。

運動の分類では、ドメイン運動、局所運動などの分類を行うが、局所運動は新たにここで、明快な定義を与える必要がある。天然変成部位がある場合は、基質結合状態で座標値が与えられていれば、それを構造変化したと扱う必要がある。

立体構造変化とリガンド結合の因果関係の検証では、すべての場合に線形応答理論が成り立つわけではないので、結合状態でリガンドが固定部と運動部の両者から近いというような定義で、因果関係を定義する必要がある。

4. 研究成果

4.1 タンパク質の揺らぎに適した新しい基準振動解析

タンパク質の平衡揺らぎは幅広い時空間スケールにわたって生じている。しかし、タンパク質揺らぎの大部分は、少数の低振動モードで指定される低次元空間内の運動によって占められていることが知られている。この低振動モードを求める簡便で有用な手法が基準振動解析である。現在までに、数多くのタンパク質にこの解析が適用され、タンパク質の揺らぎと機能の関係が明らかにされてきた。

ここで、例として、T4 リゾチームの3つの最低振動モードを図(a-c)に示す。2つのドメインからなるT4 リゾチームでは、3つの最低振動モードはいずれもドメイン運動を表していることがわかる。しかし、矢印で示された運動がドメイン運動であることを理解するには少々時間を要するかもしれない。ドメイン運動を表示するには一方のドメインの運動方向を示せば十分であるにもかかわらず、振動モードでは2つのドメインが両方とも動くような形で運動が記述されているからである。その理由は外部運動の取り扱いにある。

タンパク質の内部運動を考えるとときには、あらかじめ外部運動（並進と回転）を取り除いておく必要がある。立体構造の重ね合わせはこの作業に相当する。従来の基準振動解析ではタンパク質全体の外部運動が自動的に取り除かれる。その結果、振動モードは図(a-c)に示したような複雑な運動として表わされる。

しかし、タンパク質全体を用いた重ね合わせ (Eckart frame と呼ぶ) が運動の理解に最適であるとは限らない。ドメイン運動が起こっている場合、一方のドメインを用いて重ね合わせを行い、もう一方のドメインの動きを観察する方がはるかに運動を理解しやすい。基準振動解析でも同様のことができれば、振動モードで記述される運動の把握が容易になることが期待される。

本研究では、分子の一部分の外部運動を取り除いた場合 (non-Eckart frame) の基準振動解析を実現する方法論を構築した。その中核は、Eckart frame における共分散行列を non-Eckart frame における共分散行列へと変換する公式である。この公式によって得られた non-Eckart frame における共分散行列を対

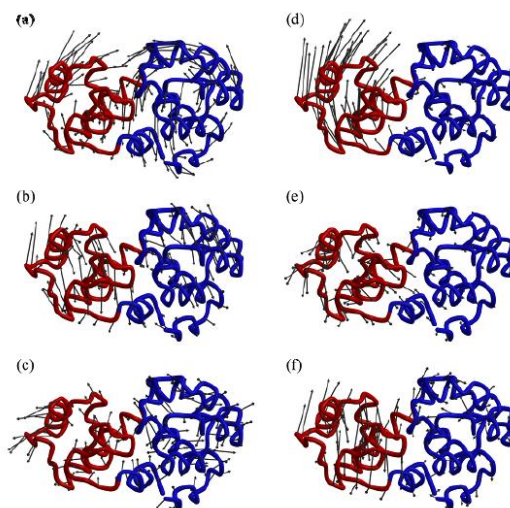


図1 T4 リゾチームの低振動モード。2つのドメインを赤と青で色付けしてある。矢印が各振動モードにおける運動の方向を示している。(a-c) 従来の基準振動解析。(d-f) 右側のドメインの外部運動を取り除いた場合。

角化することにより、望みの振動モードを得ることができる。

T4 リゾチームの一方のドメイン (図1の右側、青) の外部運動を取り除いた場合の結果を図(d-f)に示す。期待通り、3つの低振動モードはもう一方のドメイン (図の左側、赤) の運動として記述されており、いずれもドメイン運動であることが容易にわかる。

新しい基準振動解析は運動の表示法を変更したに過ぎず、従来のものと本質的に等価である。しかし、異なる視点からの解析結果は、複雑なタンパク質の運動を理解する上で大きな助けとなるだろう。また、本研究で得られた変換公式は、線形応答理論による構造変化の記述を基準振動解析に基づいて行うことを可能とする。今後、タンパク質立体構造変化の因果関係解明に役立つと期待される。

4.2 二面角系線形応答理論

我々はこれまでに基質結合と構造変化の因果関係を記述する一般的な理論であるタンパク質構造変化の線形応答理論を提案している。その理論は、最もわかりやすい形に近似すれば、

$$\langle \Delta \mathbf{r} \rangle_1 = \frac{1}{k_B T} \langle \Delta \mathbf{r} \Delta \mathbf{r} \rangle_0 \mathbf{f}_r \quad [1]$$

という形をとる。[1]式は単純な静的線形応答関係を記述するもので、右辺の基質からの相互作用力 \mathbf{f}_r が系にかかったときに、非結合状態における平衡ゆらぎの共分散行列 $\langle \Delta \mathbf{r} \Delta \mathbf{r} \rangle_0$ に比例して、左辺の基質結合によるタンパク質の座標値の変化 $\langle \Delta \mathbf{r} \rangle_1$ が求まるというものである。これによって、右辺の原因である相互作用 \mathbf{f}_r と左辺の結

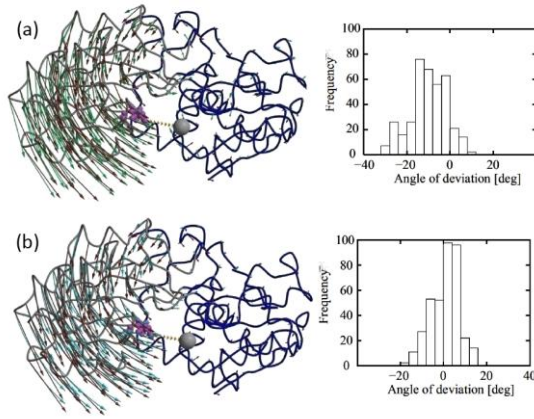


図2 鉄結合タンパク質の鉄イオン結合に伴う構造変化の予測。(a)デカルト座標系線形応答理論による予測 ([1]式)。右図は、正解ベクトルとのなす角。負の値は回転の接線方向にあることを示している。(b)二面角系線形応答理論による予測 ([2]式)。

果である構造変化 $\langle \Delta \mathbf{r} \rangle_1$ を接続する因果関係を簡潔に表現することができる。

[1]式の線形応答理論は、デカルト座標系のものである。[1]式に従って、構造変化を $\langle \Delta \mathbf{r} \rangle_1$ として直線ベクトルで表現することは、ふたつの問題を生む可能性がある。第一に、タンパク質の大規模な構造変化はドメインの剛体的な回転運動であり、それを直線のベクトルで表現しようとすると、結合状態の構造を厳密には再現できず、結合長、結合角などの共有結合によってできあがる局所構造を変形することとなる。第二に、タンパク質の局所的な運動は、ループの構造変化、側鎖ロータマーの変化と、基本的には二面角の変化として現れ、デカルト座標の変化として表現することは困難な場合がある。これらふたつの問題を回避するために、回転を表現する内部座標である二面角を自由度とする線形応答理論を開発する必要がある。

そこで我々は、以下の線形応答理論を構築した。

$$\langle \Delta \theta \rangle_1 = \frac{1}{k_B T} \left(\mathbf{K}' \langle \Delta \mathbf{r} \Delta \mathbf{r} \rangle_0^{-1} \mathbf{K} \right)^{-1} \mathbf{K} \mathbf{f}_1 \quad [2]$$

これは、基質からの相互作用力 \mathbf{f}_1 が系にかかったときに、二面角値の変化 $\langle \Delta \theta \rangle_1$ が求まるというものである。ここで、 $\mathbf{K} \equiv (\mathbf{d}\mathbf{r}/\mathbf{d}\theta)$ である。これは、単純に

$$\langle \Delta \theta \rangle_1 = \frac{1}{k_B T} \langle \Delta \theta \Delta \theta \rangle_0 \mathbf{f}_1 \quad [3]$$

とすることができないことを言っている。二面角を変数としたとき、強い非線形性のために、高次モーメントの影響が強く、[3]式の近似が成立しないため、デカルト座標系における擬調和近似を二面角系に線形変換したものをを用いた。

図2に、[1]式と[2]式による鉄結合タンパク質における構造変化を結果を比較した。図2の右にあるように、予測結果はデカルト座標系では、回転運動の接線方向に強くバイアスしているが、二面角系の[2]式による結果は、そのバイアスを正しく取り除くことに成功している。

これによって二面角系の線形応答理論が完成したと言える。

4.3 タンパク質構造揺らぎにおける主鎖二面角の補償的運動

タンパク質の構造変化は、主に主鎖二面角(ϕ, ψ)の変化によってもたらされる。タンパク質の平衡状態での構造揺らぎでは、主鎖二面角はタンパク質の球状構造を維持するためには、2つ以上の二面角が互いの二面角変位によってもたらされた動きを補償するように動く必要がある。しかし、これまでにそのようなタンパク質の二面角ダイナミクスの詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、球状タンパク質の立体構造を維持する主鎖二面角の補償的運動の仕組みを、二面角の二体相関のレベルで調べた。

多くの場合、タンパク質の平衡状態での構造揺らぎは、分子動力学(MD)シミュレーションの軌跡から得られるデカルト座標系分散共分散行列の固有値問題として解かれる主成分分析により記述され、大振幅の主成分で張られる低次元空間においてタンパク質の機能に関わる運動が説明されてきた。本研究では、二面角ダイナミクスの解析に、二面角系にあらわに存在する高次相関の影響を避けるために、デカルト座標系分散共分散行列からの線形変換によって得られた二面角系分散共分散行列を用いて二面角の二体相関を定義した。

座標値の平均二乗変位(MSD)は、二面角系分散共分散行列 Σ とメトリック行列 \mathbf{H} ($\mathbf{K}'\mathbf{K}$; $\mathbf{K} = (\mathbf{d}\mathbf{r}/\mathbf{d}\theta)$)によって以下のように記述される。

$$\text{MSD} = \text{tr}(\mathbf{H}\Sigma)/N$$

ここで、 tr は対角和を表し、 N は原子数。これから、MSDは、 \mathbf{H} と Σ の対応する固有ベクトルの固有値が順相関の時に最大値を、逆相関のときに最小値になることが理解できる。そして実際に、MDの結果は逆相関の関係を与え、MSDに最小値をもたらすことが示された(図3)。これから、二面角の補償的運動は、 \mathbf{H} と Σ との間にある固有値の逆相関によることが分かった。

\mathbf{H} の大きな固有値に対応する固有ベクトル方向(わずかな二面角の変化で大きな座標の変化を生む方向)に二面角が変位した場合、蛋白質の球状構造に歪みが生じてポテンシャルエネルギーの急激な増加を与える。従っ

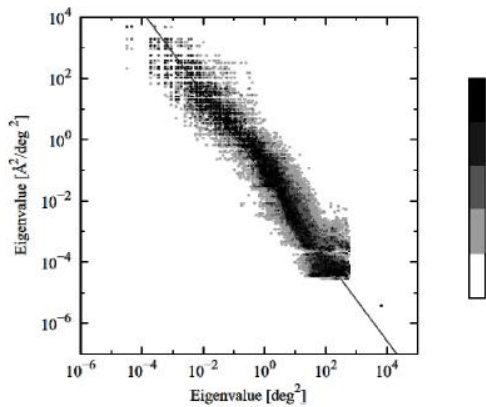


図3 インフルエンザ菌ペリプラズム鉄結合タンパク質の二面角分散共分散行列 Σ の固有ベクトル(横軸)とメトリック行列 H の固有ベクトル(縦軸)の相関係数。縦軸と横軸はそれぞれの固有ベクトルに対応する固有値を表す。相関係数の大きさはグレースケールで表した。

て、その方向は Σ の小さな固有値を持つ固有ベクトル方向(ポテンシャル面の曲率が大きい方向)と一致する。そのために逆相関が表れ、結果として二面角空間での揺らぎによる座標値の変化が小さく抑えられることとなる。これは蛋白質の球状構造がもたしている特徴であると言える。実際、同様な解析を球状でないほどけた形状のペプチドに適用すると、このような補償的運動は見る事ができなかった。この関係は、もうひとつの二面角ダイナミクスの特徴に結びつく。 H の固有値が、単位二面角変化による座標値変化の自乗であることを考えると、補償的運動における逆相関は、二面角空間での大振幅の主成分ほど座標値に小さな変化を与える。逆に小振幅の主成分は座標値を大きく変化させやすい。結果として、二面角系ではほぼ全ての主成分が均等に構造揺らぎに寄与することとなり、少数の主成分のみが支配的なデカルト系の場合と全く異なった様相を呈していることが明らかとなった。

4.4 タンパク質の基質結合に伴う立体構造変化のデータベース解析

タンパク質の分子機能はその揺らぎに即して以下のように定義できる: リガンド相互作用などの外部の刺激にตอบสนองして起こるタンパク質の立体構造の変化とそれともなう化学反応。タンパク質の立体構造変化の研究では、Gerstein や Hayward の立体構像変化データベースがあるが、分子機能につながる外部摂動と立体構像変化の因果関係の記述がない。そこで我々は、低分子リガンドの相互作用によるタンパク質立体構造変化の全

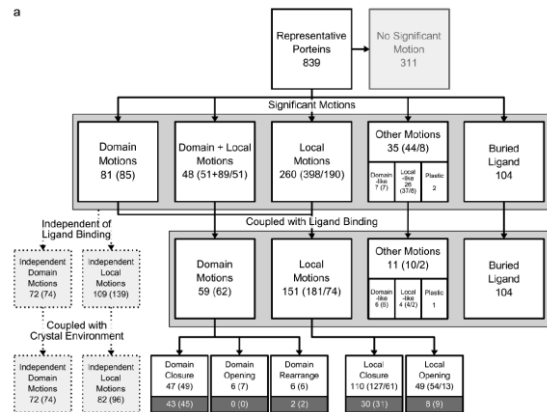


図4 低分子の結合に伴うタンパク質立体構造変化の結果

体像を明らかにするために、その因果関係の注釈付を PDB の代表構造について網羅的に行った。

低分子化合物(以下基質と呼ぶ)との結合状態と非結合状態の両者を含む立体構造の非冗長な 839 セットからなるデータベースを構築した(図 1)。その中から、閾値以下の立体構造変化に止まるもの 311 セットを除いた(図 1 第 1 層)。運動をするセットについて、その分類をドメイン運動、局所運動、他の運動、buried ligand に分類した(図 1 第 2 層)。ここで、buried ligand は、閾値以下の立体構造変化であるにもかかわらず、結合している基質がタンパク質内部に埋もれているものを指す。これは単なる例外ではなく、全体の 10% を越える新たな立体構造変化のカテゴリーである。

つぎに、基質結合と立体構造変化の間の因果関係を二つの方法で同定した: (i) 線形応答理論[1], (ii) 結晶構造における基質結合位置。線形応答理論は、

$$\Delta r = \beta \Sigma f$$

と表され、 f は原因となるリガンド相互作用、 Δr は結果としての立体構造変化を示す。 Σ は応答関数としての非摂動時の揺らぎを表現する分散共分散行列(弾性ネットワークモデルによって評価)。この計算結果が、基質結合から予想される応答である。これが結晶構造における実測の構造変化と高い相関を持てば、その因果関係が同定されたとする。基質結合位置による方法は単純に結晶構造を観察し、非結合状態では形成されたい相互作用が結合状態で現れたときに、因果関係があると同定する。

結果として、全体の 64% が基質結合が原因となって立体構造変化をしていると同定された(図 1 第 3 層)。他の 36% は、基質結合とは無関係に、結晶場にトラップされた多型のうちのふたつであると考えられる。

線形応答理論は、76% のドメイン運動を説

明することができたが、局所運動ではわずかに39%のみであった。これは、擬調和近似の範囲で、それらの基質結合に伴う立体構造変化が線形的であることを意味する。

さらに、運動を閉じる運動と開く運動に分類した(図1第4層)。ドメイン運動、局所運動ともに閉じる運動が多数であることが分かる。非線形的な運動は、ドメイン運動の開く運動と局所運動のorder-disorder転移、helix-coil転移をするものに多く観察された。実際にそのような転移運動は、局所運動の61%に上った。

機能との関わりでは、酵素反応に関わって、閉じるドメイン運動の多数は転移酵素(EC=2)が占め、動かないものは、加水分解酵素(EC=3)が占めていた。

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5件)

S. Omori, S. Fuchigami, M. Ikeguchi, and A. Kidera, Linear response theory in dihedral angle space for protein structural change upon ligand binding, *J. Comput. Chem.* 30, 2602-2608 (2009) 査読有

S. Fuchigami, S. Omori, M. Ikeguchi, and A. Kidera, Normal mode analysis of protein dynamics in a non-Eckart frame, *J. Chem. Phys.* 132, 104109 1-7 (2010) 査読有

S. Omori, S. Fuchigami, M. Ikeguchi, and A. Kidera, Latent dynamics of a protein molecule observed in dihedral angle space, *J. Chem Phys* 132, 115103 1-7 (2010) 査読有

T. Amemiya, R. Koike, S. Fuchigami, M. Ikeguchi, and A. Kidera, Classification and annotation of the relationship between protein structural change and ligand binding, *J. Mol. Biol.* 408, 568-584 (2011) 査読有

S. Fuchigami, H. Fujisaki, Y. Matsunaga, and A. Kidera, Protein Functional Motions: Basic Concepts and Computational Methodologies, *Adv. Chem. Phys.* 145, 35-82 (2011) 査読有

[学会発表] (計8件)

雨宮崇之、小池亮太郎、淵上壮太郎、池口満徳、木寺詔紀、低分子リガンド結合に関わるタンパク質構造変化のデータベース解析：結晶場の影響、第8回日本蛋白質科学会年会、2008年6月10日、東京

大森聡、淵上壮太郎、池口満徳、木寺詔紀、

蛋白質構造ゆらぎの2面角系主成分分析、第8回日本蛋白質科学会年会、2008年6月10日、東京

平山裕之、雨宮崇之、小池亮太郎、淵上壮太郎、池口満徳、木寺詔紀、タンパク質の多量体形成で観察される構造変化、第46回日本生物物理学会年会、2008年12月5日、福岡

大森 聡、淵上 壮太郎、池口 満徳、木寺 詔紀、球状蛋白質構造ゆらぎの2面角系主成分分析、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月20日、熊本

雨宮 崇之、小池 亮太郎、淵上 壮太郎、池口 満徳、木寺 詔紀、低分子リガンド相互作用に関わるタンパク質立体構造変化のデータベース解析、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月22日、熊本

Satoshi Omori, Sotaro Fuchigami, Mitsunori Ikeguchi, and Akinori Kidera, Principal component analysis of proteins in dihedral angle space、第47回日本生物物理学会年会、2009年10月30日、徳島

Takayuki Amemiya, Ryotaro Koike, Sotaro Fuchigami, Mitsunori Ikeguchi, and Akinori Kidera, Database analysis of protein structural changes upon ligand binding、第48回日本生物物理学会年会、2010年9月20日、仙台

Satoshi Omori, Sotaro Fuchigami, Mitsunori Ikeguchi, and Akinori Kidera, Compensating dynamics of a protein molecule observed in dihedral angle space、第48回日本生物物理学会年会、2010年9月22日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木寺詔紀 (KIDERA AKINORI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：00186280

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

太田元規 (OTA MOTONORI)

名古屋大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：40290895