

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23615012

研究課題名(和文) 生体環境高分子の動的立体構造分析技術の研究

研究課題名(英文) Study on analytical techniques of conformations for environmental biopolymers in dynamic equilibrium

研究代表者

和泉 博 (IZUMI, Hiroshi)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員

研究者番号：20356455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質3D立体構造にむけた超二次構造コード(SSC)を開発し、7494サブユニットの立体配座コード構造データをもつデータベースを作成した。本コード化解析手法を用いて、自己/非自己の認識にかかわる免疫性因子のもつ特徴的な超二次構造(球状タンパク質に繰り返しみられるフラグメント構造)を見出した。赤外円二色性(VCD)分光解析の成果を活用し、製薬企業に立体配座探索手法を技術移転した。

研究成果の概要(英文)：Supersecondary structure code (SSC) for 3D structural alignment of proteins was proposed, and the database of conformational code for 7494 subunits of proteins was constructed. The search method using these codes extracted the characteristic supersecondary structures (the structural regions in globular proteins folded into repetitive units) of immune factors related to self-recognition, and the fragment structures were represented as the simple description. Further, the conformational search techniques for absolute configuration determination of chiral compounds using vibrational circular dichroism (VCD) spectroscopy were transferred to a company.

研究分野：構造有機化学、環境情報化学

科研費の分科・細目：安全環境計測法

キーワード：生体高分子 立体配座 超二次構造 タンパク質 構造アライメント 構造活性相関 赤外円二色性分光法 免疫

1. 研究開始当初の背景

ウイルス・病原菌・花粉などを構成する生体環境高分子は小分子とは異なり、生体内で直接細胞膜を通過して細胞内に取り込まれることはない。そのため、細胞外にむけて突きだした受容体との選択的認識による相互作用を起こすことにより生体へ影響を及ぼしており、選択的認識のための特異な構造部位を有している。いわゆる、鍵と鍵穴の関係としてよく説明されているが、実際には鍵のようにリジッドなものではなく、相互作用前後で構造変化が連続的に起こり、最終的には相互作用前の状態に戻り、同じシグナル伝達を繰り返すことで効率的にシグナル強度を増強できるような仕組みを有している。

このシグナル増強の仕組みをうまく応用すれば新たな簡易計測法への展開も可能であることから、主に動的立体構造変化の観点からの機構解明の研究を行ってきた。その中で、溶液状態にあるあらゆる有機分子のコンフォメーション変化を記述するための立体配座コード(符号化立体配座表記法)の提案を行い、このコードを活用する生体高分子構造相同性解析技術の開発を進めてきた。

特に、本研究課題の申請時において、赤外円二色性(VCD)解析と立体配座コードを組み合わせることにより、溶液中ではピコ秒のタイムスケールにおいて、フレキシブルな有機分子はボルツマン分布に従った複数のコンフォメーションの混ざりとしてモデル化可能であることを明らかにしていた。溶液状態における有機分子は、X線結晶構造と強い相関を持ちながらも実際の分子構造は異なっていることが見出されており、生体環境高分子の生体への影響を評価するために、溶液状態におけるコンフォメーション分布の変化を把握するツールが不可欠になってくるものと考えられていた。

2. 研究の目的

様々な分光計測手法から空間分解能の高い動的構造情報を精度よく取り出すには、密度汎関数法をはじめとする第一原理計算と組み合わせることが必要である。そこで、本研究では、(1) 立体配座コードと様々な分光計測手法を組み合わせるために、日本蛋白質構造データバンク(PDBj)に登録されたタンパク質のPDB構造データを精度の高い分子構造データとして活用し、1000個を目標に立体配座コード構造データのデータベース化を進め、大量の構造データから見出される、活性と相関を持った共通する動的構造因子を特定する。次に、(2) 分光計測手法としてVCD分光法を活用し、生体環境高分子の空間分解能の高い動的構造情報を取り出すため、差スペクトル分析に焦点を当てた研究を重点的に行う。さらに、(3) タンパク質以外の有機化合物も立体配座コード自動処理変換を可能にし、密度汎関数法をはじめとする第一原理計算と組み合わせるために、PDB構造デー

タ形式を参考にしてあらゆる有機分子に適用可能な分子フラグメント接頭辞の定義の検討を進める。以上の3課題を遂行することにより、生体環境高分子の動的立体構造変化の簡易計測法にむけた基盤技術を確立することを目的として研究を進めた。以下に、得られた研究成果とその国内外への普及に向けた取り組みについて報告する。

3. 研究の方法

(1) PDB構造データを活用した構造相同性データマイニング手法の研究

まず、タンパク質のコンフォメーションを符号として記述するためにアミノ酸残基毎に図1Aに示す二面角位置コードを作成した。次に二面角位置コードに対応する結合についてIUPAC命名法の優先則に準拠して二面角を求め、その二面角に対応する二面角分類コード(図1B)に変換し、タンパク質のコンフォメーションを符号化した。

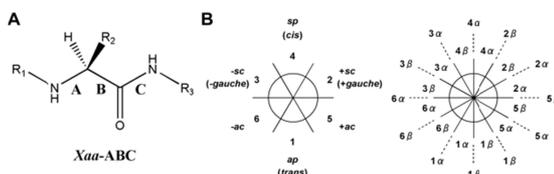


図1. 二面角位置コードと二面角分類コード

複数のタンパク質構造の対応関係にある二面角位置コードにおいて、連続した90°の範囲にある二面角分類コードに一致すれば相同性が高いと判定する「揺れ許容演算解析法」を用いて、ヘリックス型については3 5 4、シート型については6 4 4のテンプレートとの比較によりアミノ酸残基毎のヘリックス型(h)、シート型(s)及びその他の型(o)の帰属を行った。

さらに、タンパク質のアミノ酸配列において、中央付近で部分的に構造相同性の高い特徴的な立体配座コードパターンがデータマイニング可能なプログラムを作成した。構造相同性の高い数値を示すヒット件数が多くなったため、内容を吟味し、ヘリックス型(h)のみ及びシート型(s)のみの構造パターンを除いてファジー検索を行うように改良を行った。

(2) VCD分光法を用いた生体高分子測定解析手法の研究

複数のアミド結合を有する酸化型及び還元型グルタチオン2-10 mgを水500 μlに溶解しBaF₂窓板セルに載せたのち乾燥させフィルムを形成させた。赤外円二色性(VCD)分光光度計を用いてフィルムサンプルの測定を行ったところ、サンプルを0、45、90、135、180、225、270°と回転させるとVCDにおいてスペクトル変化がみられ、実験を繰り返したが再現性が得られなかった。溶液法も試してみたが、酸化型及び還元型グルタチオ

ンの溶解性が低く、解析に耐えうるスペクトルを得ることが出来なかった。

そこで、853.91 と比較的分子量が大きくかつアミド結合を有するタキソールとその骨格部位である baccatin III の 0.029 M の $CDCl_3$ 溶液を調製し、VCD 測定を行った後、その差スペクトルを作成した。同時に、タキソールと baccatin III の差分にあたる N-benzyl-(2R,3S)-3-phenylisoserine について、 $CDCl_3$ に溶解しなかったことから、 CD_3OD (0.23 M) 及び $DMSO-d_6$ (0.23 M) 溶液の VCD 測定を行った。

解析については、まず N-benzyl-(2R,3S)-3-phenylisoserine 及びその Me エステルの分子モデルを構築し、特許取得した方法を用いて配座探索を行った後、市販の非経験的分子軌道法計算プログラムを用いて密度汎関数法計算を行った。次に、得られたそれぞれの配座の Gibbs 自由エネルギーからボルツマンポピュレーションを求め、それぞれの配座の予測 VCD 及び IR スペクトルに重みづけをすることで平均化予測スペクトルを作成し、実測のスペクトルと比較を行った。

4. 研究成果

(1) PDB 構造データを活用した構造相同性データマイニング手法の研究

免疫グロブリン軽鎖と主要組織適合遺伝子複合体 MHC クラス I 分子との構造相同性について、新しく作成したプログラムの検証を行った。表 1 に示すように、5 フラグメント解析の相同性の値とフラグメント解析込みの相同性の値が一致しているケース以外に、5 フラグメント解析の相同性の値が大きく、フラグメント解析込みの相同性の値が小さいケースも見出された。

表 1. 免疫グロブリン軽鎖 (PDBID:2w9eL) の構造相同性データマイニング解析

PDBID	主鎖全体の相同性	フラグメント解析込みの相同性	5フラグメント解析の相同性	タンパク質の種類
2w9eLst.txt	1	1		1 Immunoglobulin (light chain)
1a6tAst.txt	0.6875	0.888888889		1 Immunoglobulin (light chain)
1i9rLst.txt	0.515151515	0.8		1 Immunoglobulin (light chain)
1kn2Lst.txt	0.59375	0.769230769		1 Abzyme (light chain)
12e8Lst.txt	0.516129032	0.769230769		1 Immunoglobulin (light chain)
1deeAst.txt	0.59375	0.75		1 IGM RF 2A2 (light chain)
1dn0Ast.txt	0.606060606	0.689655172		1 IGM-KAPPA COLI
1q1rAst.txt	0.537313433	0.666666667		1 IGM KAPPA CHAI
1yjdLst.txt	0.523076923	0.666666667		1 Immunoglobulin (light chain)
1hezAst.txt	0.553846154	0.612244898		1 KAPPA LIGHT CH
3eoaLst.txt	0.571428571	0.576923077		1 Immunoglobulin (light chain)
3drtAst.txt	0.492307692	0.571428571		1 Immunoglobulin (light chain)
3hc0Lst.txt	0.483870968	0.571428571		1 Immunoglobulin (light chain)
2w9dLst.txt	0.505747126	0.555555556		1 Immunoglobulin (light chain)
2fgwLst.txt	0.52173913	0.52173913		1 Immunoglobulin (light chain)
2agiLst.txt	0.507042254	0.518518519		1 YVO FAB, LIGHT
1c5bLst.txt	0.476190476	0.518518519		1 Abzyme (light chain)
1a7oLst.txt	0.433333333	0.433333333		1 Immunoglobulin (light chain)
3iy2Ast.txt	0.385964912	0.385964912		1 Immunoglobulin (light chain)
2immst.txt	0.37037037	0.37037037		1 Immunoglobulin (light chain)
3kykLst.txt	0.424242424	0.857142857	0.857142857	Immunoglobulin (light chain)
1d6cBst.txt	0.411764706	0.8		0.8 HLA-DR4 BETA
2ianBst.txt	0.405797101	0.8		0.8 HLAcII(β)
1d5mBst.txt	0.382352941	0.8		0.8 HLA-DR4 BETA
1u3hDst.txt	0.35483871	0.8		0.8 H-2AcII(β)
2bsrAst.txt	0.328358209	0.8		0.8 HLAcII(α)

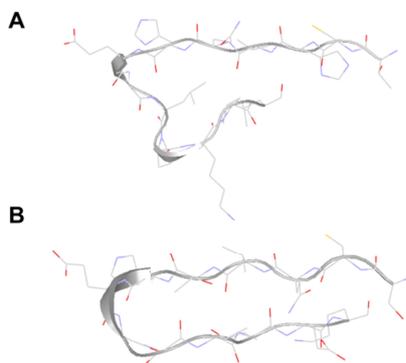


図 2. 主要組織適合遺伝子複合体 MHC クラス I, II 分子と免疫グロブリン軽鎖とに共通する主鎖構造フラグメント (A: HLA class I, 2bsrA, B: IgM リウマチ性因子, 1adqL)

前者に対応するフラグメントが、図 2 A に示す IgM リウマチ性因子には存在せず、通常の免疫グロブリン軽鎖と主要組織適合遺伝子複合体 MHC クラス I, II 分子に共通する主鎖構造フラグメント (197-203 aa., shhshss) に一致していた (表 2)。

一方、後者はプログラムの設計通り、タンパク質のアミノ酸配列において、前半部で部分的に構造相同性の高い立体配座コードパターンに対応していた。

また、構造相同性の観点から、同じグループに属するという条件をどう判定すればよいか検討を行うために、さらに、古典的、非古典的 MHC クラス I 分子も含めた一連の MHC クラス I, II 分子、免疫グロブリン軽鎖、重鎖など 20 個程度のサブユニットの構造相同性を一度に比較する手法を開発した。

先に述べた IgM リウマチ性因子には存在せず、通常の免疫グロブリン軽鎖と主要組織適合遺伝子複合体 MHC クラス I, II 分子に共通する主鎖構造フラグメントに注目してみると、古典的 MHC クラス I 分子及び非古典的 MHC クラス I 分子でも human hemochromatosis protein (HFE protein)、Zn-2-glycoprotein (ZAG)、Neonatal Fc receptor of IgG (FcRn) はこの His と Pro に挟まれたフラグメント (shhshss) を有していた。一方で、非古典的 MHC クラス I 分子の MIC (MHC class I-related chain) -A, B、CD (cluster of differentiation) 1D 及び UL-18 (サイトメガロウイルス) はこのフラグメントを持っていなかった。

ここで、HFE は鉄輸送の制御、ZAG は脂肪異化、FcRn はヒトの胎盤を通じた胎児への IgG の輸送に関与しており、MIC-A, B はストレス誘導性に発現される NK 細胞の活性化、CD1D は糖脂質の提示による NKT 細胞の活性化、UL-18 はウイルスの免疫系の監視からの回避に関与していると考えられている (梶川ら, 生化学, 2009, 81, 189-199)。IgM リウマチ性因子の存在やこのフラグメントを持たな

表 2 . 免疫グロブリン軽鎖と主要組織適合遺伝子複合体 MHC クラス I, II 分子の構造相同性比較 (186-212 aa.)

番号	Ig	Ig	Ig	HLA	HLA
	light 2w9eL	light 1a6tA	light 3hc0L	DR4 1d6eB	classI 2bsrA
186	GLU	GLU	GLU	ARG	GLY
187	ARG	ARG	LYS	SER	GLU
188	HIS	HIS	HIS	GLY	GLU
189	ASN	ASN	LYS	GLU	GLN
190	SER	SER	VAL	VAL	ARG
191	TYR	TYR	TYR	TYR	TYR
192	THR	THR	ALA	THR	THR
193	CYS	CYS	CYS	CYS	CYS
194	GLU	GLU	GLU	GLN	HIS
195	ALA	ALA	VAL	VAL	VAL
196	THR	THR	THR	GLU	GLN
197	HIS	HIS	HIS	HIS	HIS
198	LYS	LYS	GLN	PRO	GLU
199	THR	THR	GLY	SER	GLY
200	SER	SER	LEU	LEU	LEU
201	THR	THR	SER	THR	PRO
202	SER	SER	SER	SER	LYS
203	PRO	PRO	PRO	PRO	PRO
204	ILE	ILE	VAL	LEU	LEU
205	VAL	VAL	THR	THR	THR
206	LYS	LYS	LYS	VAL	LEU
207	SER	SER	SER	GLU	ARG
208	PHE	PHE	PHE	TRP	TRP
209	ASN	ASN	ASN	ARG	GLU
210	ARG	ARG	ARG	ALA	PRO
211	ASN		GLY		
212	GLU				

い非古典的 MHC クラス I 分子が制御を主目的としない活性化に深く関与している点もあわせて、His と Pro に挟まれた特徴的なフラグメント (shshsss) は、自己 / 非自己の認識がかかわるなんらかの精密な制御系の機能に携わっていることが示唆される。

実際に、この特徴的なフラグメント (shshsss) を有する -2 microglobulin が NK 細胞の活性化を抑制する leukocyte immunoglobulin-like receptor (LILR) と対のパターン (sohsss) として相互作用することが X 線結晶構造データの探索から見出された (図 3)。また、相互作用していないフリーの X 線結晶構造データとの比較から、相互作用部位の主鎖のフラグメント (shshsss 及び sohsss) は何れも比較的にリジッドであり、相互作用前後で保存されていた。

さらに、この特徴的なフラグメント (shshsss) 以外の部位の比較では、N 末端の近くに UL18 と CD1D のみに共通するフラグメント (17-24 aa., sshshsss), ZAG のみにみられる特徴的なフラグメント (54-63 aa., hshsohssh) が見出された。また、比較を行った古典的 MHC クラス I 分子及び非古典的

MHC クラス I 分子すべてで保存されている共通する構造パターン (218-233 aa., sssosssosshssss) がある一方で、古典的 MHC クラス I 分子、非古典的 MHC クラス I 分子それぞれで、構造変化が起こりやすいフラグメントであることが一因と考えられる。構造パターンに多様性がみられる部位 (239-247 aa. など) も存在していた。このように、本構造パターン解析法は多くのサブユニットのコンフォメーションを視覚的に一度に比較するのに有効な手法と考えられる。

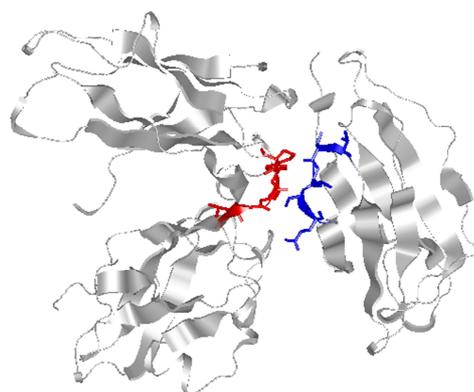


図 3 . -2 microglobulin (青: shshsss) と LILR (赤: sohsss) との相互作用 (PDBID: 2dyp)

最終的に、目標であった 1000 個を超える 7494 サブユニットの立体配座コード構造データのデータベース化を行った。構造生物学の分野で球状タンパク質にみられる -corner のような繰り返しユニットのことを超二次構造と定義されている。国際誌の査読過程において、超二次構造の簡便な記述に適していそうだと指摘を受けたことから、本コードを supersecondary structure code (SSC) と名付け、国際的な普及にむけて SSC 構造アライメント解析技術への展開を進めている。

(2) VCD 分光法を用いた生体高分子測定解析手法の研究

図 4 に、N-benzyl-(2R,3S)-3-phenyl isoserine の VCD 及び IR スペクトルを示しているが、IR スペクトルにおいて溶媒の違いによりまったく異なるバンドが観測された。このことは、溶媒の違いにより立体配座が大きく異なっていることを示している。これに付随して、VCD 分光装置の性能低下が著しくノイズの大きなスペクトルしか得られなかったが、VCD スペクトルも大きく異なっていた。さらに、単量体及び Me エステルの予測スペクトルとの比較を行ってみたが、IR スペクトルのバンドのずれが著しく、VCD バンドによる立体配座の検証は不可能であった。

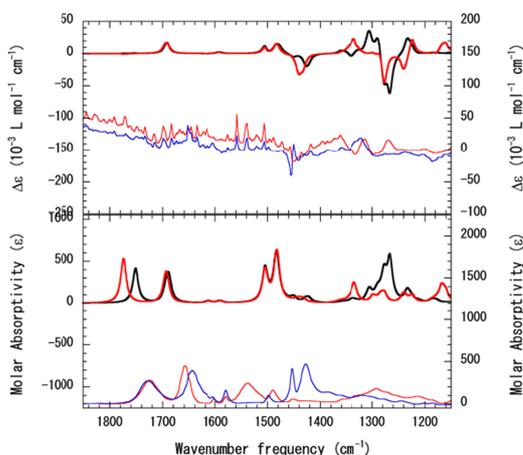


図4 . N-benzyl-(2R,3S)-3-phenylisoserine のVCD(上段)及びIR(下段)スペクトル(太線赤:単量体予測、太線黒:メチルエステル予測、細線赤:DMSO- d_6 実測、細線青:CD $_3$ OD実測)

一方で、図5にタキソールと baccatin III の差スペクトルを示しているが、IRスペクトルにおいて、N-benzyl-(2R,3S)-3-phenyl isoserine のメチルエステルの予測スペクトルとまずまずのスペクトルの一致を示した。これは、水素結合に關与する置換基の減少により、考慮すべき立体配座構造を的確に絞り込んでいることを示している。VCD スペクトルについては、IRバンドの予測波数のずれを考慮すると若干の類似性は認められたが、立体配座構造の帰属をつけるまでの精度はないといえる。これは、フリーの状態で存在する N-benzyl-(2R,3S)-3-phenyl isoserine の Me エステルの密度汎関数法計算による予測された立体配座構造とは異なり、タキソール tail の立体配座構造は baccatin III 骨格の存在による立体的制約を受けていることを強く反映していると示唆される。

以上のことから、差スペクトルの活用は差分としての有機基の立体配座構造とフリーな状態での立体配座構造がほぼ一致しないとうまく活用できなことが判明した。しかしながら、本研究で活用した立体配座探索技術が、医薬品認可に必要な絶対配置決定技術に活用できそうなことがわかったため、本研究と同時進行で製薬企業への技術の紹介も行った。その結果、知財実施契約に結び付き、その契約に基づき技術移転活動を進めた。

現在、ルーチンの手法で絶対配置の帰属を行える医薬候補分子の数は全体の約6~7割とのことであり、今後その割合を上げるべく立体配座構造予測精度の向上に努めていく。

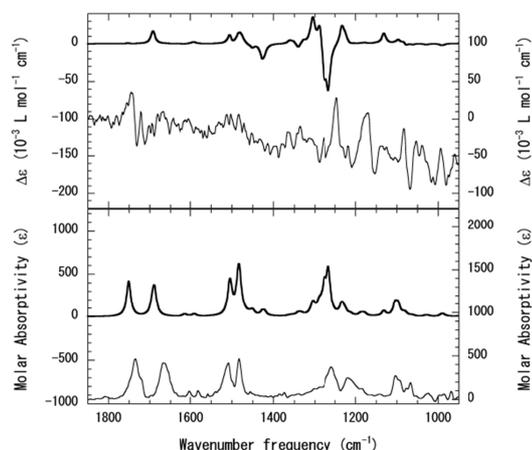


図5 . タキソールと baccatin III の差 VCD (上段) 及び差 IR (下段) スペクトルと N-benzyl-(2R,3S)-3-phenylisoserine メチルエステルの予測スペクトルとの比較(太線:予測、細線:実測)

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) H. Izumi, A. Wakisaka, L. A. Nafie, R. K. Dukor, Data Mining of Supersecondary Structure Homology between Light Chains of Immunogloblins and MHC Molecules: Absence of the Common Conformational Fragment in the Human IgM Rheumatoid Factor, *J. Chem. Inf. Model.*, 査読有, **53**, 584-591 (2013). DOI:10.1021/ci300420d

[学会発表](計8件)

1) 和泉 博、脇坂昭弘、生物発光酵素の超二次構造コードアライメント解析、日本化学会第94春季年会(2014)、2014年3月29日、名古屋大学(愛知県)

2) 和泉 博、脇坂昭弘、タンパク質超二次構造のデータマイニング解析、第36回情報化学討論会、2013年11月8日、筑波大学(茨城県)

3) 和泉 博、脇坂昭弘、L. A. Nafie, R. K. Dukor、Data Mining of Supersecondary Structure in Protein、BiW02013 - Bioinformatics Week in Odaiba -, 2013年9月11日、産総研臨海副都心センター(東京都)

4) 和泉 博、L. A. Nafie、赤外円偏光二色性分光計:VCD キラル分子アナライザー ChiralIR-2X によるキラル分子の絶対配座決定技法、JASIS 2013 新技術説明会、2013年9月4日、幕張メッセ国際展示場(千葉県)

5) 和泉 博、脇坂昭弘、立体配座コードのパターン処理によるタンパク質ループ構造のデータマイニング、日本化学会第 93 春季年会(2013)、2013 年 3 月 22 日、立命館大学(滋賀県)

6) 和泉 博、脇坂昭弘、L. A. Nafie、R. K. Dukor、Structural Homology Analysis of Nonclassical Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I molecules with the Common Main-Chain Fragments in the Light Chains of Immunoglobulins Using Conformational Code、BiW02012 - BioInformatics Week in Odaiba -、2012 年 10 月 31 日、産総研臨海副都心センター(東京都)

7) 和泉 博、脇坂昭弘、キラル医薬品やタンパク質計測にむけた立体配座コード構造パターン解析技術、日本化学会第 92 春季年会(2012)、2012 年 3 月 27 日、慶應義塾大学(神奈川県)

8) 和泉 博、L. A. Nafie、R. K. Dukor、タンパク質立体配座構造パターン解析技術の開発、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 13 日、つくば国際会議場(茨城県)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：人工生物発光酵素に用いるための発光基質

発明者：金 誠培、和泉 博、田尾博明、鳥村政基、脇坂昭弘

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2013-217560

出願年月日：2013 年 10 月 18 日

国内外の別：国内

名称：タンパク質の構造評価装置、構造評価方法、構造評価プログラム及び構造評価プログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体

発明者：和泉 博、脇坂昭弘

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2013-115700

出願年月日：2013 年 5 月 31 日

国内外の別：国内

〔その他〕

研究活動トピックス

工業的に注目すべき研究成果として選定され、カナダの Advances in Engineering 社のホームページに掲載された。

<http://advanceseng.com/chemical-engineering/data-mining-supersecondary-structure-homology-light-chains-immunoglobulins-mhc-molecules-absence-common-conformational-fragment-human-igm-rheumatoid-factor/>

産業財産権実施契約(計 1 件)

名称：光学活性分子の優位な立体配座の探索方法

発明者：和泉 博、山上奏子、二夕村 森

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特許第 3991106 号

国内外の別：国内

ホームページ等

研究紹介 URL

<http://staff.aist.go.jp/izumi.h/>

産総研オープンラボ 2013

<http://www.aist.go.jp/digbook/openlab/2013/pageindices/index109.html>

産総研オープンラボ 2012

<http://unit.aist.go.jp/emtech-ri/ci/event/20121026/text/op15konfo.pdf>

産総研オープンラボ 2011

<http://www.aist.go.jp/digbook/openlab/2011/index.html#page=61>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和泉 博 (IZUMI, Hiroshi)

独立行政法人産業技術総合研究所・
環境管理技術研究部門・主任研究員

研究者番号：20356455