

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26730148

研究課題名(和文)蛋白質における埋もれた極性残基の機能評価のためのデータベース構築

研究課題名(英文)Development of a database of buried polar residues in protein structures

研究代表者

城田 松之(Shirota, Matsuyuki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00549462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質は主に疎水性相互作用によって水溶液中で安定な構造を取るが、蛋白質内部に埋もれた極性残基が作る水素結合などの相互作用も構造と機能に重要な役割を果たす。しかし、これらの埋もれた極性残基は比較的稀な事象ととらえられており、天然の蛋白質における解析は十分に行われてこなかった。本研究ではこれらの埋もれた極性残基をProtein Data Bankから網羅的に集計し、立体構造のパターンと進化的保存についての特徴を解析したものである。これらの成果は蛋白質立体構造予測やデザインに応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Although hydrophobic interactions are the driving force of protein folding, polar interactions, such as hydrogen bonds, which buried polar residues make are also important for protein structure and function. However, polar residues that are buried in the protein interior and sequestered from water are considered to be exceptional conformations, whose occurrences, intra-molecular interactions and conservations in natural proteins have not been well studied. In this study, I performed a comprehensive survey of the buried polar residues in the non-redundant protein structures of Protein Data Bank (PDB), focusing on patterns of their side-chain interactions and evolutionary conservation. These results highlight the structural and evolutionary importance of buried polar residues in protein structures and will be beneficial for protein structure prediction and protein design.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：蛋白質立体構造 データベース 水素結合 進化的保存

1. 研究開始当初の背景

水溶液中で蛋白質は、非極性側鎖が内部に埋め込まれることによる疎水性相互作用を駆動力として、天然構造に折りたたまれる。一方、疎水的環境である蛋白質内部においては主鎖や側鎖の極性を持つ官能基は互いに水素結合を形成することで安定な構造を保っている。このように内部に埋もれた極性残基が構造の安定性に与える影響は、周囲の残基と適切な水素結合を形成できるかどうかによる。しかし、このような残基はそもそも頻度が少ないことから、天然の蛋白質における役割については不明な点が多く、十分な統計的解析が行われてこなかった。

一方で、研究代表者は Protein Data Bank (PDB)における蛋白質構造の統計解析からこのような埋もれた極性残基は蛋白質サイズが大きくなるほど頻度が増すことを報告した。蛋白質が大きくなると、相対的に内部の比率が増加し、表面の比率が減少する。そのため表面にいらなくなって内部に埋もれる極性残基が増加するのである。このことは、埋もれた極性残基は生物学的に重要な大きさの蛋白質の安定性や機能の発現において重要な機能を担っていると考えることができる。また、研究代表者は、PDB中の立体構造における原子間距離の統計をもとに原子ペア相互作用のスコア関数を作成し、様々な蛋白質構造の評価を行った。その結果、埋もれている極性残基はその頻度の少なさから、適切な水素結合などをしていても疎水性残基よりも安定性が過小評価されることが分かった。このような研究の蓄積から、埋もれた極性残基についてより大規模なデータベース解析を行い、側鎖が埋もれる構造の分類と、進化における重要性を明らかにする必要があるという発想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究を発展させる形で、極性残基の蛋白質内部での埋もれ方を網羅的に解析し、蛋白質構造における役割を明らかにし、さらに、この知識をデータベース化し、蛋白質デザイン等に役立つツールを構築することを目指した。

本研究では以下を目的とした

- (1) PDBから埋もれた極性残基の網羅的に同定すること
- (2) 埋もれた極性残基が作る分子内相互作用の分類
- (3) 埋もれた極性残基の進化的な保存解析
- (4) 埋もれた極性残基が疎水性残基と置換されているケースの網羅的な検証

3. 研究の方法

PDBに含まれる全蛋白質アミノ酸配列から配列相同性を除いた、非冗長な約7,000蛋白質構造からなるデータセットを作成した。この中から、Accessible Surface Area (ASA)が0である残基を埋もれていると定義した。また、極性残基として Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Arg, Lys の9種類を取り扱った。データセットの約7000の蛋白質構造から埋もれた極性残基を同定し、その構造と進化的保存についての解析を行った。

埋もれた極性残基の構造については、その側鎖が作る蛋白質分子内の水素結合、cation- π 相互作用、塩橋といった極性相互作用によって分類した。また、進化的保存については非冗長な蛋白質アミノ酸配列データセットである UniRef90 データベースに対して PSI-BLAST による検索を行い、マルチプル配列アラインメントを作成し、その中で埋もれた極性残基の位置が同じ残基で占められている比率を検討した。

4. 研究成果

網羅的なデータベース検索により蛋白質中の埋もれた極性残基を検出することが出来た。

(1) 極性残基の埋もれる頻度の比較

まず、様々な埋もれの基準において極性残基がどの程度の割合で埋もれていると判定されるかを検討した。立体構造における残基の相対 ASA (rASA)、すなわち露出している相対的な表面積が 30%、20%、10%、0%以下を埋もれていると判定したとき、より小さい(厳しい)基準を適用するほど、埋もれている残基の数は減少した。極性残基の埋もれやすさはおおむね Ser (S) > Thr (T) > His (H) > Asn (N) > Gln (Q) > Asp (D) > Arg (R) > Glu (E) > Lys (K) という順番

であり、His が部分的には Ser, Thr より埋もれやすいが完全には埋もれにくいという特徴があるが、その他はアミノ酸の埋もれやすさの順番は埋もれの基準には大きくは影響されなかった(図1)。以上の結果から、完全に埋もれているケースを考えるため、もっとも厳しい rASA=0 を埋もれているとする基準で以下の解析を行った。

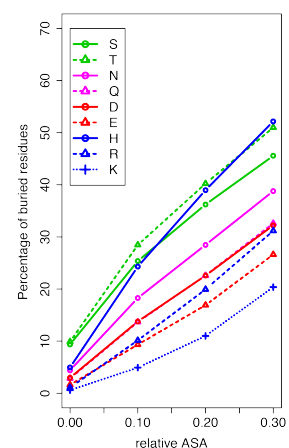


図1 極性残基の埋もれる頻度

(2) 埋もれた極性残基側鎖の作る相互作用次に、埋もれた極性残基が極性相互作用を作るとき、どのような相手と相互作用をする

のかを検討した．具体的には，相互作用として埋もれた残基の側鎖と他の残基との水素結合，cation- π 相互作用，塩橋を考えた．これらの相互作用を分類する上で，相互作用相手残基の二次構造（ヘリックス，シート，ループ），埋もれた極性残基との配列上の距離，および相手原子の主鎖側鎖の別で分類した．配列上の距離は，埋もれた極性残基とその相互作用相手の間に含まれる，連続する二次構造要素のブロックの数として，0~2 を近距離，3~10 を中距離，11 以上を遠距離と定義した．また，ラダーを共有する ストラン

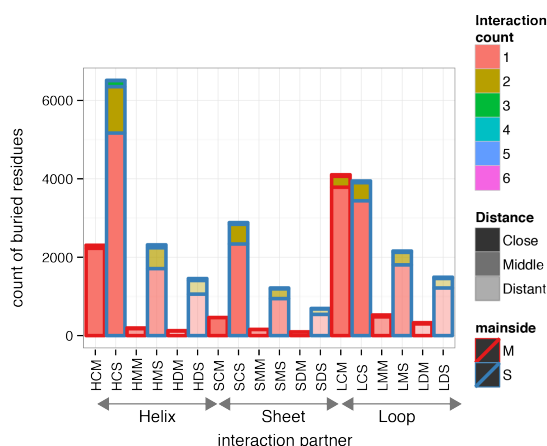


図 2 埋もれた Glu 残基側鎖の相互作用

ド間の相互作用は近距離であると見なした．埋もれた極性残基の側鎖が作る極性相互作用の統計から，相互作用相手の二次構造はループ構造が多く見られた．特に主鎖原子との相互作用が多く，これは埋もれた極性残基の側鎖がループ構造の主鎖を安定化するために重要な役割を果たしていることを示す．これに対して，ヘリックスやシートの残基と相互作用する際は，相手の側鎖と相互作用するケースが多かった（図 2）．また，Ser, Thr は配列上近距離のヘリックス・ループの主鎖との水素結合が多く含まれ，これはヘリックスの N-capping やループの中の turn 構造などのモチーフを反映していると考えられる．

埋もれた極性残基を表面の極性残基と比較したとき，予想されるように，どのアミノ酸もより多くの蛋白質分子内極性相互作用を作っていた．また，表面の極性残基側鎖はどれもアミノ酸配列上近傍の残基と極性相互作用を作ることが多かったが，一方で，埋もれた極性残基も Ser, Thr のような側鎖の小さな残基は配列上近傍の残基と相互作用する傾向にあったが，その他の残基は配列上中距離，遠距離の残基とも同程度に相互作用する傾向が見られた．このことは極性残基が埋もれることによって配列上より遠くの残基同士が極性の相互作用を持つ必要があることを示しており，極性残基の埋もれが立体構造上の局所的なものというよりも全体構造に影響を与えていることが示唆される．

(3) 埋もれた極性残基の進化的保存

埋もれた極性残基の構造と機能における重要性を評価するため，データセットの蛋白質配列それぞれについて UniRef90 データベースに PSI-BLAST を用いて検索をかけてマルチプル配列アラインメント (MSA) を作成し，埋もれた 20 種類のアミノ酸残基の MSA 上の位置が，それ自身で占められている比率の分布を比較した．この結果，埋もれた Asp, Glu, Arg, Lys などの荷電を持った極性残基の位置はその多くがほとんど (95%以上) その残基自身で占められていた (図 3)．これに対して，Val, Ile, Leu, Met などの疎水性残基は互いの間で置換が起こることがよくあり，その残基自身で占められる頻度は低かった．このことは，埋もれた極性残基はメチレン基一つの違いも許されないほど構造において特徴的な位置を占めることを意味すると考えられる．

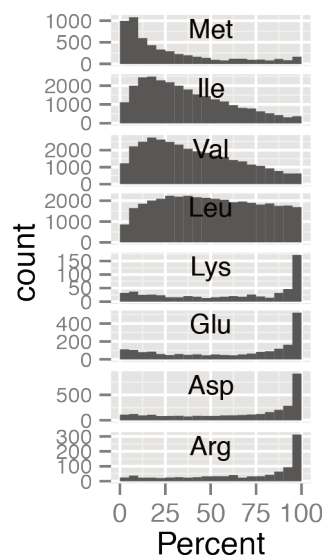


図 3 埋もれた残基の保存度の分布

(4) 埋もれた極性残基と疎水性残基の置換
埋もれた極性残基がホモログにおいて疎水性残基に置換されるケースと，そのときの周囲の残基の置換パターンを検討するために，データセットの蛋白質に対して (3) で作成したマルチプル配列アラインメントを元に位置特異的スコア行列を作成し，それを用いて PDB に含まれる蛋白質全体への相同性検索を行い，相異なる蛋白質における置換パターンを検討した．その結果，埋もれた極性残基が疎水性残基に置換されたケースを同定できた．これらの埋もれた極性残基は分子内極性相互作用を作っており，他の極性残基の側鎖と相互作用しているケースでは，埋もれた極性残基が疎水性残基に変わると，相互作用相手も疎水性残基に置換されるか，あるいは相互作用相手の失われた極性相互作用を他の疎水性残基から極性残基への置換によって補っているケースがあることがわかった．このような現象は疎水性残基の埋もれがどのように生じ，進化的保存・あるいは変更されるかを考慮する上で重要な情報であると考えられる．

一例として *Penicillium canescens* endo-1,4-beta-xylanase XylE (以下 PcXylE,

PDB ID 4F8X)と *Thermotoga petrophila* RKU-1 xylanase 10B (以下 TpXyl10B, PDB ID 3N1Y) における埋もれた極性残基の例を挙げる。この2つの蛋白質は細胞壁のヘミセルロース分解に働く酵素のホモログである。PcXylE においては3つの荷電性残基 E52, E68, K256 が蛋白質内部に埋もれているが, TpXyl10B においてこれらは埋もれた疎水性残基の L242, I60, L44 に置換されている。PcXylE の埋もれた3つの荷電性残基は蛋白質内で他の側鎖と水素結合を作っているが, これらの水素結合相手の残基も TpXyl10B では疎水性に置換されている。例えば, PcXylE において K256 は Q252 と S299 の側鎖極性原子と水素結合を形成しているが, TpXyl10B においてはこれらの残基は F238, I284 に置換されている。つまり, 蛋白質内部の水素結合ネットワークがまとめて疎水性コアに置換されていた。E52 から L44 の置換においても同様のパターンが見られた。一方で, PcXylE の E68 は R107 と T70 と水素結合をしている。TpXyl10B の該当する残基はそれぞれ L60 と H99, T62 である。PcXylE の T70 は E68 から水素結合を提供されているが, TpXyl10B ではこれを失ってしまう。しかし, 代わりに PcXylE においては疎水性残基であった V311 が TpXyl10B において極性の Q295 となり, 代わりに水素結合を提供していることがわかった。つまり, 水素結合ネットワークの一部の極性残基が疎水性残基になると, そこで失われた相互作用を補うように疎水性残基から極性残基への変化が起こることがあることがわかった。

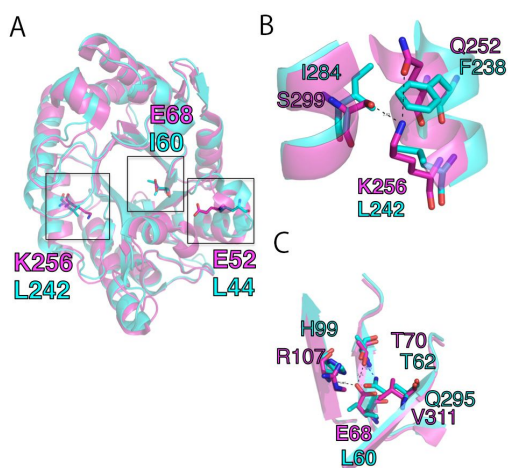


図 2 PcXylE と TpXyl10B での埋もれた極性残基の置換

埋もれた極性残基は多くの場合においてその側鎖が安定な相互作用を持っている。(3)で行った埋もれた極性残基の保存度の解析とあわせて考えると, 蛋白質の進化において分子内部の極性相互作用は特異的であり, 強い選択圧がかかっていると同時に, これらの一部が置換されると, その水素結合ネットワークの大幅な組替えが必要になるというこ

とが示唆される。以上の結果から, 蛋白質における埋もれた極性残基は単なる例外的事象ではなく, 進化的にも重要な蛋白質立体構造の特異性を決める局所構造パターンであると言える。

(5) 今後の展望

本研究で埋もれた極性残基の構造と進化的保存についての網羅的な検証を行うことが出来, 極性残基の埋もれ方についての理解が深まった。蛋白質の内部においては疎水性相互作用が安定化要因として強調されることが多いが, 蛋白質内部での水素結合も大きく寄与することが実験的に示唆されており, またデータベース解析によると多くの蛋白質が埋もれた極性残基を持つことがわかっている。しかし, これらの埋もれた極性残基は蛋白質構造の中で稀なものとして考えられてきたためにその相互作用についての理解が遅れていた。本研究で蓄積したこれらの相互作用についての情報を公開し, 生物物理, 生化学, バイオインフォマティクスの研究者が広く使えるデータベースを作成することは蛋白質の立体構造予測手法や蛋白質デザインにおいて有用であると考えられる。

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)

[学会発表](計4件)

1. 城田松之. 蛋白質における埋もれた極性残基の進化的保存. CPS 研究会. 2015年9月29日. ホテルこもれび(滋賀県雄琴市)
2. 城田松之. 埋もれた極性残基の進化的保存. 第53回日本生物物理学会. 2015年9月14日. 金沢大学(石川県金沢市)
3. Matsuyuki Shirota. pdbBAM: a comprehensive mapping of Protein Data Bank proteins on the human genome. Matsuyuki Shirota. ISMB/ECCB2015. July 14, 2015, Dublin, Ireland
4. 城田松之. タンパク質における埋もれた極性残基の構造と置換パターンの網羅的解析. 第52回日本生物物理学会. 2014年9月26日. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城田 松之 (Shirota Matsuyuki)
 東北大学・医学系研究科・助教
 研究者番号: 00549462