

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
2. 補助事業課題名：タンパク質の複合体構造・相互作用に関する総合的な予測・解析の実施と高度化
3. 研究開発代表者：国立大学法人東京大学 教授 清水 謙多郎
4. 研究開発の成果

### ○ 支援の成果

#### (1) ウシ二量体グレリン受容体（GHSR）と $G_{\alpha}(q)$ タンパク質との相互作用部位の推定

GHSR は二量体を形成し、それらの細胞内 loop 3 のヘテロ DelR242 変異個体に、雄牛の成長期における増体形質、放牧適性に関連する管囲などの体型形質が見られることが知られている。本支援では、こうした変異が形質に与える影響を解析することを目的とするもので、GHSR-G タンパク質の 1 対 1 複合体モデル、さらに GHSR 二量体-G タンパク質の 2 対 1 複合体モデルを作成し、MD シミュレーションを用いてその妥当性を確認するとともに、loop 3 の変異と相互作用に関与する G タンパク質の残基の特定を行った（図 1）。すでに成果は G3: Genes, Genomes, Genetics 誌に発表している。

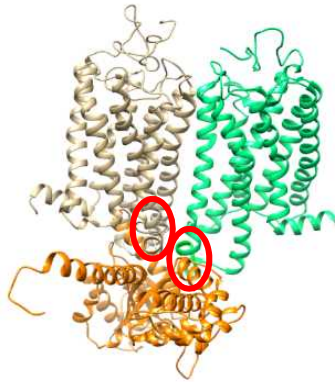


図 1

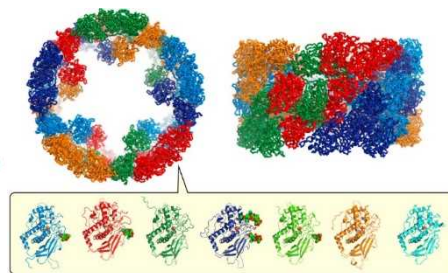


図 2

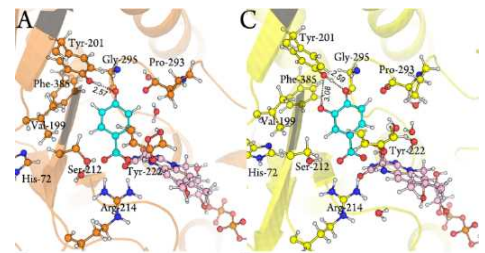


図 3

#### (2) 分子量 4MDa の巨大蛋白質ヘモシアニンの階層構造の解析

分子量 4MDa の巨大タンパク質ヘモシアニンは、約 50kDa の機能ドメインが 8 つ連続してつながった約 400kDa のサブユニットが 10 個円状に会合した構造をとっている。支援依頼は、この 80 のドメインどうしについて、構造類似性、接触界面の計算、回転対称性の評価を網羅的に行うというものである。PDB ファイルを 80 の機能ドメインごとに分割し、全ペアについて、立体構造・配列比較、接触表面積の計算、ドメイン間水素結合と塩橋の検出を行って、複合体構造の特徴を明らかにした（図 2）。成果は、Structure 誌に発表している。

#### (3) 酵素改変による没食子酸の効率的な生産法の開発

没食子酸は、そのアルカリ性水溶液が還元剤として使用され、エステルで酸化防止剤としても使用されている工業的に有用な化合物である。我々は、すでに、高い効率で 3,4-dihydroxybenzoate (DOHB) を没食子酸に変換する *p*-hydroxybenzoate hydroxylase (PHBH) の変異体を設計することに成功し、すでにその成果は特許となっているが、さらに、変異体の没食子酸生成効率が高い理由を明らかにすることで、さらなる生成効率の向上につなげる研究を進めている。そのため、MD シミュレーションにより、変異体と基質の複合体の立体構造を解析し、さらに量子化学計算により、変異体における反応メカニズムを明らかにした（図 3）。

#### (4) 黄色ブドウ球菌のヘム輸送機構の解明

黄色ブドウ球菌のヘム輸送機構 Isd system (IsdH-N3, IsdA, IsdC) は黄色ブドウ球菌封じ込めのタ

ターゲットタンパク質として研究されている。各 Isd タンパク質の構造は似ているが、ヘムに対し異なる親和性を示す。本支援では、MD シミュレーションによる各残基の結合エネルギー推定と ITC 測定により、親和性の違いを生み出すタンパク質の構造ループを発見した。また、その構造ループに対する変異実験と計算を行い、親和性の機構を解明した。すでに成果は *Biochemistry* 誌に発表している。また、昨年度は、MD シミュレーションと量子化学計算を用いて、ヘムの受渡しの反応解析を行い、その成果を *PLoS ONE* 誌に発表した。

## ○ 高度化の成果

### (1) マルチスケール MD によるリガンド結合過程の詳細な解析

粗視化モデルを用いたリガンド結合シミュレーションの手法を開発した。粗視化 MD を実施することにより、リガンドは本来のリガンド結合部位以外にも結合すること (図 4)、結合構造 (図 5)、リガンド結合・解離速度定数、解離定数が実験をよく再現することが示された。また、リガンドは、特定のパスウェイを通してリガンド結合部位に結合することが示唆された (図 6)。

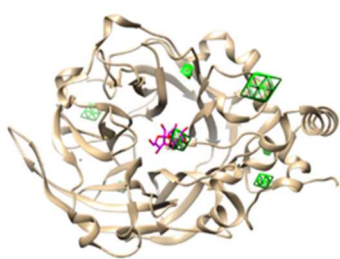


図 4

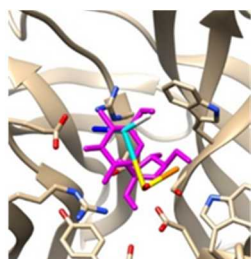


図 5

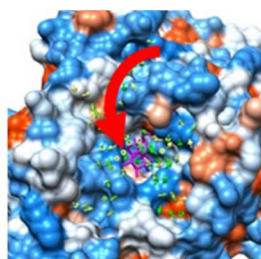


図 6

図 6 は、成果を投稿した *J. Comput. Chem.* 誌の表紙にも採用された。

さらに、物理化学特性の異なるリガンドおよびリガンド結合部位に適用し、解離定数の計算値が実験値を非常によく再現できていることを示した。また、再現できなかったものについては、結合構造でリガンドとタンパク質の粗視化粒子が衝突する場合や、量子化学的相互作用が存在する場合はパラメータを調節することで、実験値に近い値が得られることを示した。

### (2) タンパク質の総合的な相互作用予測・部位予測手法の開発

与えられた任意のリガンドの結合部位を、その予測ツールを自動生成することで予測するシステムを開発した (図 7)。その結果、*LigandRFs* などと比較して平均して高い性能を達成し、金属イオン、脂質など、特定のリガンドをターゲットにした予測システムに比べて、同等かそれ以上の性能を達成した (図 8)。その成果は、*Bioinformatics* 誌で発表している。

#### タンパク質の配列、リガンド

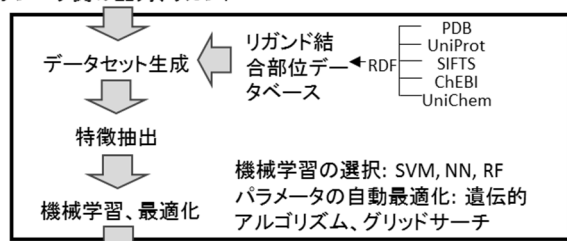


図 7

Ligand name	Sens. (%)	Spec. (%)	MCC	AUC
Purine nucleotide	37.4	98.0	0.484	0.850
Lipid	24.0	97.4	0.331	0.798
Fe	49.3	99.3	0.615	0.904
Zn	40.6	99.2	0.555	0.835
Mn	34.7	99.1	0.484	0.869
FAD	43.2	96.8	0.630	0.906
AMP	20.8	98.3	0.320	0.808
SF4	75.5	97.7	0.781	0.952

図 8

そのほか、脂質結合タンパク質の機能予測でも、特徴抽出の手法を新たに開発し、従来の手法よりも高い予測精度を達成した (成果は *RJLBPCS* 誌に発表済み)。また、タンパク質-タンパク質結合予測において、配列情報のみを用いたチロシンキナーゼのリガンド-レセプタペアの予測で、AUC 値が 0.996 という、世界最高水準の予測精度を達成した (*Adv. Bioinformatics* 誌で発表済み)。