

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（X線小角散乱法から得られる情報の相関解析）
3. 研究開発代表者：東京薬科大学生命科学部 教授 小島正樹
4. 研究開発の成果

構造・機能予測に関する支援

1. Abl interactorファミリータンパク質の構造・機能相関

Abl interactor (Abi)は、チロシンキナーゼ c-Abl と相互作用してがんの転移を促進するが、Abi-3 は他の Abi ファミリーとその作用機作が異なる。Abi-1 と Abi-3 の全長の立体構造をホモロジーモデリング、フラグメントアセンブリ、スレディング法を用いて予測したところ、Abi-1 と Abi-3 では、異なる作用機作で複合体を形成されることが示唆され、実験結果をよく説明することができた。依頼者の希望により、成果を *Cell Communication and Signaling* **13**, 41 (2015)に発表した。

2. アガリクス由来βグルカンの構造解析

アガリクス (*Agaricus brasiliensis*) 由来の多糖βグルカンは免疫賦活作用を通じて抗腫瘍効果が報告されている。NMRによる一次構造分析の結果、βグルコースが1-6グリコシド結合でつながった主鎖に、1-3グリコシド結合による微量の分枝を含むことが示された。水溶液中における分子動力学法シミュレーションの結果、推定された一次構造を有するβグルカンは、平衡状態においてらせん構造を形成していた。さらに、人体におけるβグルカンの受容体と考えられるレクチン受容体との複合体予測を行ったところ、らせん構造をとっているときに正しく結合することが示唆された。

分子設計に関する支援

3. GST活性検出蛍光プローブの開発

制御拠点合成領域の依頼により、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)に特異的に結合する蛍光プローブを、ドッキングシミュレーション、複合体予測など *in silico* の手法を用いてデザインした。また実際に合成した化合物と GST との結合活性を測定するために、蛍光ストップフロー法による測定系を確立した。

SAXSによる相関解析に関する支援

4. 鉄・ラクトフェリン複合体の会合状態の解析

生乳中に含まれるラクトフェリン (LF) は、多量の鉄イオンを配位するため抗貧血作用を示し、鉄欠乏症に対する食品として注目されている。鉄・ラクトフェリン複合体の SAXS 解析により、LF は 70 当量の鉄イオンを介して会合し、15 量体を形成することが示された。また会合過程の pH 依存性から、会合には溶液中に含まれる重炭酸イオンが関与することが示唆された。LF 単量体の結晶構造と SAXS データから、鉄・ラクトフェリン複合体の立体構造モデルを構築した。SAXS 測定は、解析拠点解析領域の高エネルギー加速器研究機構の支援により行い、*Photon Factory Activity Report 2015*, **32B** 347 に報告した。全体の成果については、依頼者と相談し、論文準備中である。

高度化

5. X線小角散乱 (SAXS) 情報の相関解析

SAXS と他の構造情報を組み合わせて、束縛条件付き分子動力学法により、全ての入力情報を満足するタンパク質の立体構造を系統的かつ合理的に構築するアルゴリズムを確立し、SAXS_MD プログラムとして実装した。またこのプログラムを種々のフォールドクラスに属する 9 個のタンパク質に対して適用し、

SAXSデータとNMRによる二次構造情報から、タンパク質の立体構造をアミノ酸残基レベルの精度で決定することに成功した。成果は*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 65-69 (2013)に論文として発表した。また開発したSAXS_MDプログラムは、研究室のWebサイト (<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~bioinfo/saxs/>) に公開し、希望者に提供している。

6. SAXSから得られる構造の精密化

SAXSデータからDAMMINやGASBORなどの*ab initio*計算により得られたビーズモデルに対し、グラフ理論のハミルトン路探索アルゴリズムを用いて、主鎖候補をトレースするプログラムを作成した。このプログラムを70個のタンパク質の結晶構造から構築したビーズモデルに適用したところ、真の主鎖を正しくトレースすることができた。また実測のSAXSビーズモデルにおいて、N末端からC末端までトレースできなかった場合に対して、最長トレース経路を出力するオプションを実装した。開発したプログラム群は、TraceBeadsパッケージとして研究室のWebサイト (<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~bioinfo/saxs/>) に公開し、希望者に提供している。

7. X線広角散乱 (WAXS), 真空紫外円二色性 (VUV-CD) と二次構造情報との相関解析

7個のタンパク質の実測WAXSデータから二次構造情報を抽出し、 α ヘリックスの構造パラメータとWAXSプロファイルとの相関を明らかにした。またVUV-CDスペクトルとアミノ酸配列からの予測により得られるアミノ酸残基レベルの二次構造情報を、上記5で開発したSAXS_MDプログラムに実装するための束縛条件への変換法を検討し、正しく立体構造を形成することに成功した。

8. SAXSと二次構造情報によるタンパク質の立体構造の構築法の確立

上記5で得られたアミノ酸残基レベルの精度を有する構造モデルを初期構造として、創薬に必要な原子レベルの精度まで精密化するための分子動力学シミュレーションの計算条件について検討した。これにより、上記5~7の高度化も踏まえて、SAXSデータと、WAXSまたはVUV-CDによる二次構造情報から、タンパク質を簡便かつ迅速に正しくフォールディングさせる立体構造構築法 (下図) の確立を進めている。成果はサーバとして公開し、利用者に提供する予定である。

