

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：タンパク質の立体構造及び相互作用推定のための構造インフォマティクス技術の開発
3. 研究開発代表者：所属 国立研究開発法人産業技術総合研究所
役職 研究グループ長
氏名 富井 健太郎

4. 研究開発の成果

創薬等に向けた研究課題に対してバイオインフォマティクス技術による支援を行った。選定課題では、以下に述べる、インフルエンザウイルスに対する新規阻害剤開発に向けた研究、疾患対象寄生生物の細胞内輸送因子の構造・機能解析に関する研究、タンパク質医薬品の改良に関する研究、種々の疾患に関与する細胞死を司る caspase の作用機序の解明に向けた比較解析に関する研究、タンパク質の細胞内輸送因子に関する研究等に対して、タンパク質ドメインの推定や立体構造予測、あるいは相互作用推定といった多様なインフォマティクス技術を用途に応じて利用した支援を行い、論文発表等の形で成果を公表することができた。またこうした研究活動を支えるインフォマティクス技術の高度化に向けた研究開発を行い、タンパク質立体構造予測法 FORTE の改良版 DELTA-FORTE を開発・公開するとともに、支援にも活用した。これまでに開発した新規高感度アミノ酸置換行列 MIQS に関する成果も発信することができた。

インフルエンザウイルスの新規阻害剤開発に関する支援においては、スクリーニングにより理化学研究所で同定された、ウイルスのタンパク質 NP を標的とする非常に強力なウイルス阻害効果を示す化合物の最適化や医薬品化に向けた支援を行った。当該化合物の物性には大幅な改善の余地が残されており、阻害機序等を明らかにする必要性が生じていたため、バイオインフォマティクス技術を用いて、タンパク質 NP における当該化合物の結合部位の推定や NP と化合物の複合体の構造情報解析等を行った。またこうした解析を基に変異実験が行われ、推定の妥当性が示唆される結果が得られた。本研究の成果は、*PLoS Pathog.* 誌で発表された。

疾患対象寄生生物の細胞内輸送因子の機能解析に関する支援においては、赤痢アメーバやマラリア原虫等の寄生生物に対する感染防御や創薬研究の推進に向けた病原機構解明のため、国立感染症研究所と共同で、寄生生物にユニークに進化したと考えられる細胞内輸送因子の分子機構の解明を目指している。今年度は新たな系統特異的膜タンパク質推定パイプラインを構築し、赤痢アメーバに特有な細胞内小器官であるミトソームに局在する新規膜タンパク質候補群を同定し、実験による検証が行われた。本研究の成果は、*Mol. Biochem. Parasitol.* 誌で発表された。また、マラリア及びトキソプラズマで分子輸送に関わるタンパク質の進化解析支援のために、バイオインフォマティクスの手法を用いて対象タンパク質のドメインや機能部位などの探索を行った。

IgG Fc 融合タンパク質技術の開発に関する支援においては、ヒト IgG Fc 領域との融合タンパク質で懸念されている完全長 Fc 領域を介した免疫活性化(エフェクター機能)による細胞障害の回避に向け、東京工科大学で開発された Fc のヒンジ領域を欠失させた新規融合タンパク質の作用機序理解に向け、バイオインフォマティクスの技術を用いた支援を行った。完全長 Fc 融合タンパク質及びヒンジ領域欠失 Fc 融合タンパク質の糖鎖を含めた立体構造モデルの構築及び、Fc 受容体との複合体構造モデルの構築を行い、両者の作用の相違に関連すると考えられる部位や特徴等の発見につながった。こうした研究成果をまとめた論文を準備中である。

Caspase の比較解析に関する支援においては、様々な疾患に関与する細胞死を司るタンパク質である caspase の細胞内での作用機序の解明に向け、開発手法である FORTE をはじめとするバイオインフォマティクスの技術を用いて、支援依頼者等により同定されたサンゴの caspase とその制御に関連すると考えられる相同なタンパク質との複合体構造のモデリングを行い、相互作用様式などを推定した。こうした結果を含む共同研究の成果は、*BMC Genomics* 誌で発表された。進化の途上で caspase-10 を失ったと考えられるマウスがもつ caspase-8 の立体構造モデルを構築し、活性部位を中心とする構造上の特徴等の調査及び類縁タンパク質との比較を行い、その基質特異性や進化に関する考察を行った。こうした結果を含む共同研究の成果は、*Bioessays* 誌で発表された。また caspase の類縁タンパク質と考えられる c-FLIP についても多様な生物種の c-FLIP の立体構造モデルを構築し、機能に関連すると考えられる保存領域の構造上の変化の観察や進化に関する考察を行った。これらの結果を含む共同研究の成果は *Biochem. Biophys. Reports* 誌で発表された。

タンパク質の細胞内輸送に関わる因子の構造/機能解析の支援においては、ミトコンドリアのタ

ンパク質輸送装置である TOM 複合体の構造と機能の解明に向け、バイオインフォマティクスの技術を用いて、TOM 複合体のサブユニット間及び TOM 複合体と輸送基質の前駆体タンパク質間の架橋実験データを活用し、TOM 複合体の立体構造及び輸送機序の解析に関する支援を行った。前年度までに構築した複合体モデルに基づき、複合体構造精査のための新たな架橋実験計画が立案、実行された。この実験結果から得られた、新たなサブユニット間相互作用や複合体間相互作用などについてのヘテロな実験データに基づき、また高度化された FORTE や立体構造推定技術等を用いることで、これらデータに無矛盾な複合二量体および複合三量体構造モデルを構築した。さらに TOM 複合体-前駆体タンパク質間の架橋実験データに基づく構造モデルの物性解析から、タンパク質輸送の鍵となる物理化学的な特徴も発見できた。この支援を通じた研究は国際的な共同研究となり、その成果をまとめた論文が *Science* 誌に発表された。

上記以外の本事業で選定された課題(及び申請には至っていない)支援要請に対し、種々のインフォマティクス技術を活用し、実験の計画・立案や解析の効率化等の支援を行うとともに、必要に応じ、技術活用のための指導等を行った。また、事業内の生産拠点の愛媛大学からの依頼により、同大学で新たに同定された ABA アゴニスト化合物と植物の ABA 受容体との複合体の予測を行い、実験結果を説明し得るモデルを得た。こうした成果をまとめた論文を準備中である。

高度化では、タンパク質の立体構造予測及びドメイン推定法の改良を実施した。高度化された立体構造予測のためのプロファイル比較法である DELTA-FORTE は、上述の TOM 複合体解析の支援や世界的規模の構造予測実験 CASP/CAPRI にも用いられた。DELTA-FORTE のサービスを提供するために web site を構築・整備し、一般への公開を行った。FORTE のサービスのポータルサイト(<http://forteprtl.cbrc.jp/forte/>)から利用可能となっている。DELTA-FORTE 等を利用して参加したタンパク質複合体予測実験 CAPRI についての論文を他参加者及びオーガナイザーとともに作成し、*Proteins* 誌に掲載された。また DELTA-FORTE 等により計算されるペアワイズアラインメントに基づくマルチプルアラインメント法の開発を行った。比較的精度の良いペアワイズアラインメントを利用すると、やや粗い近似ではあるが高速なアルゴリズムを用いてもマルチプルアラインメントの精度の向上が確認できた。また、精度向上に有効な新規指標を考案できた。こうした成果をまとめた論文を準備中である。上記に加え、本事業で開発した高感度アミノ酸置換行列 MIQS の開発に関する総説記事を *Methods Mol. Biol.* 誌に発表することができた。また同行列の近似アラインメント法への適用についての成果をまとめた論文を投稿し、現在査読中である。

理化学研究所と共同で行っているタンパク質結晶改善に向けた予測法の開発では、これまでに行ったタンパク質の結晶パッキング部位に関する統計解析に基づいて、局所構造に応じた結晶改善に適したアミノ酸変異を提示する新たな手法の開発を行った。理化学研究所と対象タンパク質及び変異候補部位について協議・検討し、理化学研究所で実証実験が行われた。この実験でわれわれの作業仮説に合致する結果が得られており、成果をまとめた論文を準備中である。

文献

- Kakisaka M, et al., A Novel Antiviral Target Structure Involved in the RNA Binding, Dimerization, and Nuclear Export Functions of the Influenza A Virus Nucleoprotein. *PLoS Pathogens*, 11(7), e1005062 (2015).
- Santos HJ, et al., Screening and discovery of lineage-specific mitochondrial membrane proteins in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, S0166-6851(16)30001-9 (2016).
- Moya A, et al., Functional conservation of the apoptotic machinery from coral to man: the diverse and complex Bcl-2 and caspase repertoires of *Acropora millepora*. *BMC Genomics*, 17, 62 (2016).
- Sakamaki K, et al., Evolutionary analyses of caspase-8 and its paralogs: Deep origins of the apoptotic signaling pathways. *Bioessays*, 37(7), 767-76 (2015).
- Sakamaki K, et al., Conservation of structure and function in vertebrate c-FLIP proteins despite rapid evolutionary change. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 3, 175-89 (2015).
- Shiota T, et al., Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science*, 349(6255), 1544-8 (2015).
- Lensink MF, et al., Prediction of homo- and hetero-protein complexes by protein docking and template-based modeling: a CASP-CAPRI experiment. *Proteins* (2016).
- Tomii K and Yamada K, Systematic Exploration of an Efficient Amino Acid Substitution Matrix: MIQS. *Methods in Molecular Biology*, 1415, 211-23 (2016).