

# タンパク質複合体における低分子輸送経路同定手法の開発

理学専攻・情報科学コース 矢野 緑里

## 1 はじめに

酵素は、化学反応の触媒として機能する生体高分子のことであり、おもにタンパク質である。すべての酵素は、化学反応の触媒をするために固有成り最適な形状をしており、特定の基質とだけ結合するポケット状の活性部位をもつ。生体中の化学反応では、ひとつの反応の生成物が次の反応の基質（出発物質）となり、連続して反応が起こる。こうした一連の反応はパスウェイと呼ばれ、さらにつながりを形成し、複雑な生体反応システムを構築する。パスウェイを形成する酵素は複合体を形成することで、活性部位どうしをつなぐ経路（低分子輸送トンネル）を構築し、基質を輸送する場合があることが報告されている[1]。

しかしこのような低分子輸送トンネルがパスウェイにどの程度存在するのか、またトンネルの存在がパスウェイにどのような効果をもたらしているのかなどは、明らかにされていない。現在、酵素の構造データはX線結晶解析などの手法で約60%程度が明らかになっているが、これらのデータから低分子輸送トンネルを検出する手法はまだ確立していない。

そこで本研究では、タンパク質立体構造データベース（Protein Data Bank: PDB）[2]にあるタンパク質複合体データから、低分子輸送トンネルを自動探索する手法を開発した。すでにトンネルがあるとわかっているタンパク質複合体に適用し、トンネルの形状を考察した。

## 2 提案手法

グリッド空間に酵素の構造を配置し、酵素表面からの各グリッド点までの距離に基づくスカラー関数のラプラスアンを得る。これは、離散的ポアソン方程式を解くことに相当する。ラプラスアンは勾配の発散を意味するので、ポアソン方程式に与える勾配の吹き出し口部分が極大になる。トンネルは、出入口以外は酵素を形成する原子の壁で覆われているため、トンネルの軸は吹き出し口に相当することになる。そこで、検知したいトンネルの軸付近に位置するグリッドがもつラプラスアンの値が極大になるようにスカラー場を設定し、計算を行った。その後、閾値以上の値をもつグリッドを空間配置にもとづいてクラスタリングし、クラスターの形状と分布を解析することでトンネルの座標を決定した。

### 2.1 グリッド空間の構築

PDB から取得した任意のタンパク質立体構造情報をもとに、タンパク質がおさまるグリッド空間を作成した。グリッド幅は  $L(\text{\AA})$  とし、以下、グリッド空間はグリッド座標  $Q(x_j, y_j, z_j)$  とする。

### 2.2 トンネルの座標を計算

まずグリッド座標  $Q(x_j, y_j, z_j)$  がタンパク質の内部に存在するのか、あるいは外部に存在するかを同定する。この際、タンパク質を構成する原子の排除体積効果を考慮する。タンパク質を構成する原子座標  $P(a_i, b_i, c_i)$  と  $Q_j$  の距離  $d$  を計算し、原子半径  $R_i(\text{\AA})$  と比較する。距離  $d < R_i$  ならば  $Q_j$  はタンパク質の内部、そうでなければ外部にあると判定した。

つぎにスカラー場  $u(x_j, y_j, z_j)$  を計算する。  $Q_j$  とタンパ

ク質内部にあると判定した全グリッド座標  $Q_k(x_k, y_k, z_k)$  との距離  $r_k$  を計算し、  $1/r_k^2$  の和をスカラー場  $u(x_j, y_j, z_j)$  とした（ただし  $j \neq k$ ）。離散的に表現したラプラスアン式(1)にスカラー場  $u$  を適用し  $f(x_j, y_j, z_j)$  を求めた。

$$f(x_j, y_j, z_j) = \frac{1}{4L^2} \left\{ \begin{aligned} &u(x_{j+2}, y_j, z_j) + u(x_j, y_{j+2}, z_j) + u(x_j, y_j, z_{j+2}) \\ &+ u(x_{j-2}, y_j, z_j) + u(x_j, y_{j-2}, z_j) + u(x_j, y_j, z_{j-2}) \\ &- 6u(x_j, y_j, z_j) \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

### 2.2 トンネルの座標の同定

ラプラスアン  $f$  の値が閾値以上かつタンパク質の外部にあると判定したグリッドのうち、グリッド座標間の距離  $h \leq \sqrt{3} \times L$  をみたすグリッドをクラスタリングした。クラスターごとに、そのクラスターに含まれるグリッドのラプラスアンの値の平均値、分散値、クラスターの体積を計算してトンネル座標を決定した。

## 3 適用結果

### 3.1 テスト構造

幅は一定で内径と外径の異なる「ちくわモデル」10種類を作成し（表1, 図1(1), (2)), グリッド幅  $L=1.0, 1.1, \dots, 5.5\text{\AA}$  の範囲で提案手法を適用した。その結果の一部を図1(3)に示す。図1(3)は  $L=1.0\text{\AA}$  でちくわモデルAに提案手法を適用した結果で、赤色部分が検知できたトンネルである。

ちくわモデル	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
内径(単位:Å)	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	14.0	16.0	2.0	2.0
外径(単位:Å)	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	11.0	14.0

表1: ちくわモデルの内径と外径

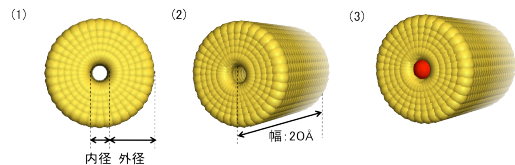
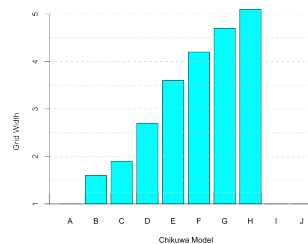


図1: ちくわモデルA

まず内径の異なるちくわモデルA~Hの結果を比較する。ラプラスアンの値の閾値を調べているときにトンネルを検知している場合があれば、そのグリッド幅ではトンネルを検知できると判定し、その結果をグラフ1に示す。モデルの内径の大きさによってトンネルを検知できるグリッド幅に違いがあることから、グリッド幅の大きさによって検知できるトンネルの内径が決まることがわかった。



グラフ1: ちくわモデルの内径とトンネルを検知できたときのグリッド幅  $L$  の関係

つぎに外径の異なるちくわモデル A, I, J の結果を比較する。モデルの外径が異なるとラブラシアン値の最大値や最小値は異なるが、いずれのモデルも同じラブラシアン値の閾値の場合にトンネルを検知することができた。したがって、トンネルの外径が異なっても内径が同じであればラブラシアン値の閾値を設定することができ、さらにトンネルをラブラシアン値で定義可能であることがわかった。

### 3.2 トンネルがある酵素

トンネルが存在することがすでに知られている酵素に提案手法を適用し、新規開発手法が目的通りに機能するかを確かめた。ここではアスパラギン酸合成酵素[3]とトリプトファン合成酵素[4]への適用結果をまとめる。ちくわモデルに適用した結果と基質の大きさを考慮し、グリッド幅  $L=1.5\text{\AA}$  で適用した。ここでトンネルとは、原子で囲まれている空間でかつタンパク質表面につながる出口が2つ以上ある構造とした。

#### 3.2.2 アスパラギン酸合成酵素

アスパラギン酸合成酵素は、アスパラギン酸とアンモニアからアスパラギンを合成する最終合成過程に関与する酵素である。二量体を形成するが、1つのサブユニットに活性部位が2箇所あるので、サブユニットごとに分割して提案手法を適用した。その結果を図2に示す(トンネル部分は赤色の球の集合体で表示)。図2(1)の矢印はトンネルの出入口を示す。図2(2)では検知できたトンネルの全体を示すために、一部のアミノ酸残基を削除した。

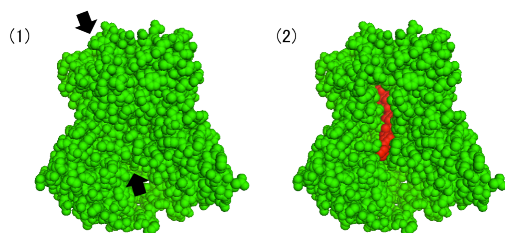


図2: アスパラギン酸合成酵素で検知できたトンネル (PDB ID:1ct9, chain A)

PDBには立体構造以外の原子情報も含まれているので、その構造が決定された状態を知ることができる。そこで、すでにトンネルが見つかった状態のアスパラギン酸合成酵素の情報とPDBに登録されているアスパラギン酸合成酵素の情報を比較すると、アスパラギン酸合成酵素は同じ状態であることを確かめることができた。

#### 3.2.1 トリプトファン合成酵素

トリプトファン合成酵素は、トリプトファンの生合成の最終段階を触媒する酵素である。二量体を形成し、それぞれのサブユニットに活性部位が1箇所ある。PDBにはさまざまな条件下(pH, 温度, 解像度など)で解析されたトリプトファン合成酵素の構造が登録されており、その数は74種類にのぼる。これらすべてに提案手法を適用した。その結果の一部を図3に示す(トンネル部分は赤色の球の集合体で表示)。図3(1)の矢印はトンネルの出口を示す。図3(4)では検知したトンネルの全体を示すために、一部のアミノ酸残基を削除した。検知したトンネルのなかには、出入口の位置が異なるものも含まれていた。トンネルを検知できなかった結果のなか

には、タンパク質表面とつながる出口が埋まっているが内部にトンネルの形状の一部が存在したもの、トンネルが途中で分断されているような形状のもの、まったくトンネルが存在しないものなどがあつた。

そこでトンネルの形状変化をみるために、図4(1)のトンネルを検知できた結果(トンネル部分はピンク色の球の集合体)と図4(2)のトンネルが分断されていると考えられる結果(トンネル部分は青色の球の集合体)を比較した。図4(1), (2)の2つの構造を重ね合わせたものを図4(3)に示す。図4(1), (2)の構造が重なることから、図4(2)は分断されたトンネル一部であるがわかる。よって、トンネルは分断される状態があることが示された。立体構造の決定状態が異なることから、トリプトファン合成酵素のトンネルは一定の形状を保っているのではなく、基質の移動に応じて、動的に変化するものであることが示唆された。

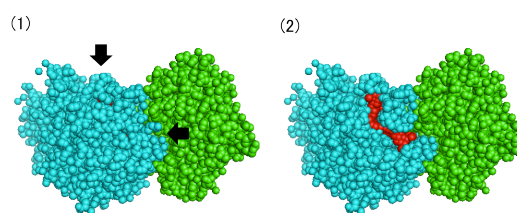


図3: トリプトファン合成酵素で検知できたトンネル (PDB ID: 1a5b)

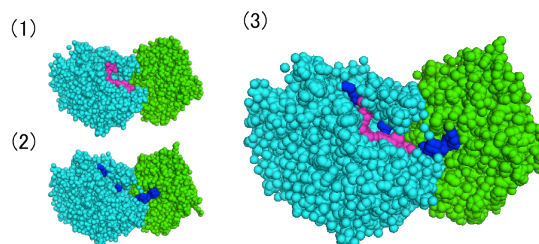


図4: トリプトファン合成酵素のトンネルの形状変化 ((1) PDB ID: 1a5b, (2) PDB ID: 1k7x)

## 5 まとめ

本研究では、酵素内部のトンネルを検出する手法を提案し、トンネルがあることが知られている酵素でPDBに立体構造が登録されているアスパラギン酸合成酵素とトリプトファン合成酵素に新規開発手法を適用した。適用結果と立体構造の決定状態からトンネル形状変化を分析することができた。

## 参考文献

- [1] Frank M. R., James B. T., Hazel M. H.: Enzymes with Molecular Tunnels, *Account of Chemical Research*, **36**(7), 539-548, 2003.
- [2] RSCB PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- [3] Todd M. L., Susan K. B., Sheldon M. S., Nigel G. J. R., James B. T.: Three-Dimensional Structure of Escherichia Coli Asparagine Synthetase B: A Short Journey from Substrate to Product, *Biochemistry*, **38**(49), 16146-16157, 1999.
- [4] Hyde C. C., Ahmed S. A., Padlan E. A., Miles E. W., Davies D. R.: Three-Dimensional Structure of the Tryptophan Synthase  $\alpha_2\beta_2$ , Multienzyme Complex from Salmonella Typhimurium, *Biological Chemistry*, **263**(33), 17857-17871, 1988.