

酵素にある基質輸送トンネルの探索

矢野 緑里(指導教員:由良 敬)

1 はじめに

生体中の化学反応は、数多くのタンパク質が関与することで進行する。これらのタンパク質は触媒機能を持ち、化学反応の前後においてタンパク質そのものは変化することなく、化学反応を促進する。このようなタンパク質を酵素とよぶ。ある低分子(基質)の化学反応が酵素によって触媒され、別の物質(生成物)が素早く生成され、その生成物が次の化学反応の基質となって、新たな分子へと変化していく。この一連の反応をパスウェイとよぶ。一連の化学反応が、生体中でどのように起こっているのかは、まだ明らかにされていない。近年、ある二つの酵素の間に、基質を輸送すると考えられるトンネル構造が見つかった。このことから複数の酵素が巨大複合体を形成することで、閉じられた空間で基質をやりとりし、基質が拡散することなく反応が敏速に進行しているのではないかと考えるようになってきた。

基質輸送トンネルはコンピュータグラフィックスを使って視覚的に探索されるのが一般的である。しかし、可視化による基質輸送トンネルの探索は、非常に時間がかかり、トンネルを見落とす場合もある。また、タンパク質立体構造データベース PDB(Protein Data Bank)に登録されているタンパク質は8万個以上になっており、これらの中から、基質輸送トンネルを手動で探し出すことは、実質的に不可能である。

そこで本研究では、PDBの座標データからトンネルを自動探索するプログラムを開発する。さらに、新規に開発したプログラムの実行結果を考察する。

2 関連研究

タンパク質の立体構造解析技術の進歩により、巨大酵素複合体の立体構造が明らかにできるようになり、それらの中に基質をやりとりするためのトンネルの存在が報告されるようになってきた[1]。基質輸送トンネルは、トリプトファンを合成する酵素ではじめて発見された。全長は約 25Å である(図1)[2]。図1にあるように、化学反応Aの生成物であるインドールがトンネル内部を通り、化学反応Bの基質となり、生成物であるトリプトファンが合成される。トンネルには、ある活性部位で生成された物質が、次の活性部位に直接移動できるようにする役割があると考えられる。この酵素以外にも、カルバモイルリン酸合成酵素にもトンネルが見つかり、三箇所の活性部位を結ぶ全長約 100Åのトンネルがある。

以上のトンネルは、研究者がタンパク質立体構造を可視化し、目で発見してきた。この過程を自動化するため、今までにいくつかのトンネル発見プログラムが開発されてきた[3]。しかしこれらの手法でも、発見過程を完全に自動化することはできていない。

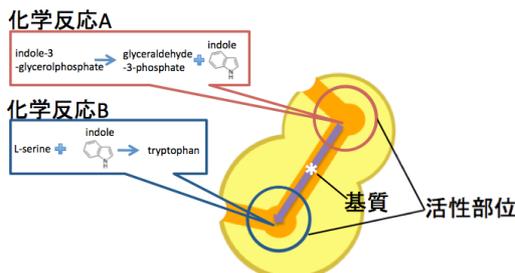


図1: トリプトファン合成酵素の基質トンネルのモデル

3 計算手法

3.1 トンネルの候補となる座標を求める

PDBから取得した座標データから、そのタンパク質が完全に収まる直方体を求める。縦、横、高さの3辺の長さは各座標の最大値と最小値の差から求める。そして、一辺 L Å (可変値) の立方体で直方体を分割し、各頂点から構成されるグリッド座標 (x,y,z) とタンパク質を構成する原子の座標 (a,b,c) に式(1)を適用する。 R は (a,b,c) に位置する原子の半径である。タンパク質を構成するすべての原子において、式(1)を一度でもみたす (x,y,z) はタンパク質の内部に埋まっているグリッドであり、トンネルを構成する空間に位置しない。これは、原子の排除体積効果を考慮することを意味する。

$$\sqrt{(x-a)^2 + (y-b)^2 + (z-c)^2} < R \quad (1)$$

3.2 トンネルの座標をしぼりこむ

グリッドによる離散空間において、式(1)のポアソン方程式を数値的に解く。この方程式に与える式(3)のスカラー場は、グリッド座標 (x,y,z) とタンパク質内部の座標 (x',y',z') との距離 r を用いて定義する。

$$f(x,y,z) = \frac{\partial^2 u(x,y,z)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u(x,y,z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u(x,y,z)}{\partial z^2} \quad (2)$$

$$u(x,y,z) = \sum_{r \leq 12} \frac{1}{r^2}, \quad r^2 = (x-x')^2 + (y-y')^2 + (z-z')^2 \quad (3)$$

スカラー場 $u(x,y,z)$ に吹き出し口があると、その部位のラプラシアン $f(x,y,z)$ は極大となる。 $f(x,y,z)$ が極大のグリッドをつなぐことで、トンネルの軸部分またはタンパク質内部の空洞の中央部分が見つかるはずである。

4 計算結果と考察

実行結果をタンパク質立体構造可視化ツール PyMOL[4] を使って示す。

4.1 テスト構造

計算方法をテストするために、図2に示す構造(ちくわモデル A, B)を作成し、上記の計算手法を適用した(図3)。モデル A では、 $L=1.0\text{\AA}$ の時には外側、 $L=3.0\text{\AA}$ の時にはトンネルの軸、B では、 $L=1.0\text{\AA}$ でトンネルの軸、 $L=2.0\text{\AA}$ で内側を検知した。このことから、 L の値によってラプラシアンが極大になる部位が異なることがわかった。また、モデル A, B でトンネルの軸を検知する L の値が異なることから、トンネルの内径によって L を変える必要があることがわかった。

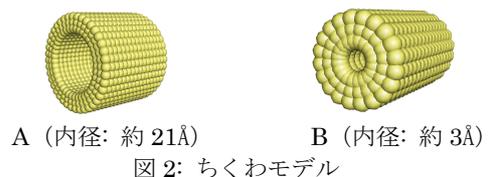
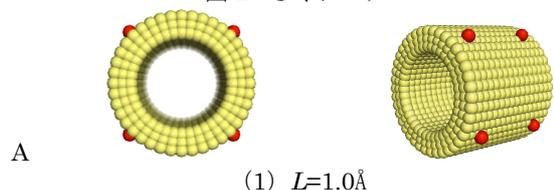


図2: ちくわモデル



(1) $L=1.0\text{\AA}$

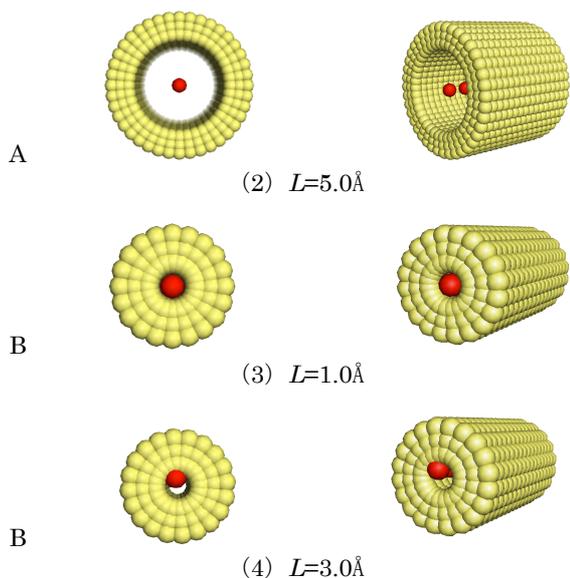


図 3: 実行結果 (左: 正面, 右: 右横)

4.2 トリプトファン合成酵素

酵素内部にトンネルが存在することがすでに知られているトリプトファン合成酵素は、多くの研究者が、さまざまな条件下でその立体構造を解析し、座標データが PDB に登録されている。PDB を検索したところ、トリプトファン合成酵素の構造データを 50 個取得することができた。これらすべてにトンネル探索プログラムを適用した。PDB ID が 1a5b のトリプトファン合成酵素の結果の一部を図 4 に示す。

トリプトファン合成酵素内部のトンネルの形状は、先のテスト構造のように単純ではない。よって、グリッドをわずかにずらしながら計算を繰り返し適用し、スカラー場の極大値曲線を見だせるようにした。その結果、トンネルの軸以外にも検知されてしまうことがわかった。しかし、これらの極大値曲線の中に、トンネルの軸が存在することを確認できた (青色楕円)。

$L=3.1\text{\AA}$ では主にタンパク質表面の凹凸、 $L=3.4\text{\AA}$, 4.8\AA ではトンネルの軸にスカラー場の極大値点があり、 $L=3.4\text{\AA}$ ではトンネル中央の部分、 $L=4.8\text{\AA}$ ではトンネル両端を検知している。実際のデータでも、分割される L の値と検知される部分に依存関係があることが明らかになった。この例では形状が細い部分を $L=3.4\text{\AA}$ 、太い部分を $L=4.8\text{\AA}$ で検知している。

異なる条件で立体構造が決定されたトリプトファン合成酵素に $L=4.8\text{\AA}$ (想定される基質の大きさ) でトンネルを探索したところ、図 5 のようになった。同一の L の値にもかかわらず、トンネルの形状が異なっていた。1ttp ではトンネルが二つに分断されているが、1beu ではトンネルが 1 本につながっている (青色楕円)。このことから、トンネルの形状は動的に変化していることが示唆され、トンネルが開閉することで、基質の移動が制御されてと考えることができる。1beu に見られるトンネルが細くなっている部分に位置する原子は、ダイナミックに動いて基質の通過を調整しているのかもしれない。

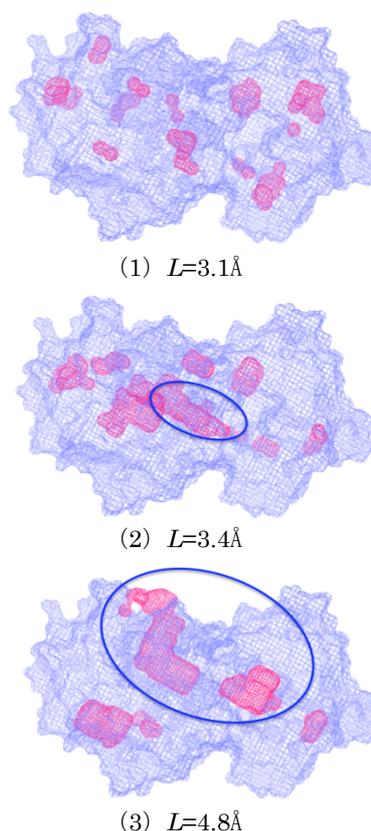


図 4: 1a5b におけるグリッドサイズとトンネルの形状関係

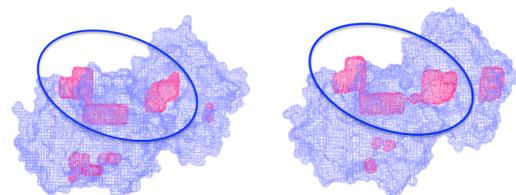


図 5: トンネルの形状変化 (左: 1ttp, 右: 1beu)

5 まとめ

本研究では、酵素内部のトンネルを探索する手法を提案し、トリプトファン合成酵素 50 個に適用した。その結果、トンネルは一樣に同じ直径ではなく、形状の一部が細いことがわかった。さらに、トンネルを遮断していたり、狭めたりする原子があることもわかった。

今回開発した手法は、高速に PDB 全体を探索することができる。1a5b (約 $3 \times 10^4 \text{\AA}^3$) の実行時間は、約 6.9 秒であったことから、PDB に登録されている約 8 万個のタンパク質 (総体積: 約 $18 \times 10^8 \text{\AA}^3$) すべてに対する検索は、 $L=4.8\text{\AA}$ の場合に、約 5 日で完了できる。

6 今後の課題

タンパク質表面の凹凸が検知されず、トンネル軸を示す極大値曲線だけを見つけれられるようにする。その上で、この工程を自動的にできるようにする。また、プログラムのさらなる高速化も目指す。

参考文献

- [1] Frank M. Raushel, James B. Thoden and Hazel M. Holden: Enzymes with Molecular Tunnels, *Account of Chemical Research*, **36**, (7), 539-548, 2003.
- [2] Gregory A. Petsko and Dagmar Ringe: Protein Structure and Function, New Science Press, London, pp.82-83, 2004
- [3] CAVER, <http://caver.cz/index.php?sid=120>
- [4] PyMOL, <http://www.pymol.org/>