

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成 16 年度採択研究代表者

由良 敬

((独) 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 研究副主幹)

「低分解能生体超分子像からの原子構造構築技法」

1. 研究実施の概要

ナノバイオテクノロジーの基礎となるデータにおいて、タンパク質の非常に大きな複合体(生体超分子)の立体構造データは重要な位置を占める。生体中で実際に機能しているタンパク質は生体超分子を構成する場合が多く、その動作原理を理解するには立体構造が不可欠である。現在、生体超分子の構造を明らかにするには電子顕微鏡が広く用いられている。しかし電子顕微鏡像による解析では、一般的には原子レベルの解像度を得ることはむずかしい。一方、原子解像度で立体構造を解明できるX線結晶解析では、生体超分子の構造決定は分子の大きさゆえに困難である。そこで本研究では、X線結晶解析によって原子分解能で明らかにされている要素タンパク質(生体超分子を構成するタンパク質)の立体構造を、電子顕微鏡でえられている生体超分子全体構造像にあてはめることで、生体超分子の原子分解能構造を作り出す計算手法を開発することを目的としている。具体的には、超分子構成要素間の界面を推定するためのバイオインフォマティクス、要素タンパク質の特性を生かした電子顕微鏡像への当てはめ技法、要素タンパク質の構造変化を考慮するための分子動力学シミュレーションなどを開発し、実データに適用することで精度よい生体超分子の高分解能構造をえることをめざす。

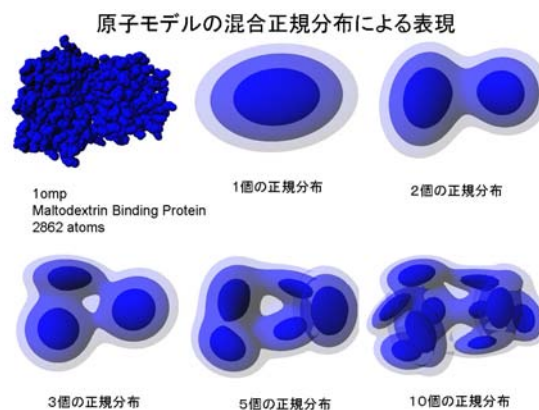
平成17年度の研究により、低分解能の生体超分子像に高分解能の要素タンパク質を高速であてはめる手法の開発、要素タンパク質とRNAとの界面を推定するバイオインフォマティクス手法の開発、要素タンパク質の柔らかさを考慮したあてはめ法の開発、および実データとして脳神経系分子の構造とDNA複製装置であるクランプはめ込み用超分子の構造と機構解析を展開することができた。平成18年度以降はこれらの手法と開発進行中の手法を組み合わせ、生体超分子の高分解能構造をえる手法のプロトタイプを完成させ、チーム内で得られる測定データに適用し、生物学的に有意義な解析をおこなう予定である。

2. 研究実施内容

平成17年度において、以下の4点の成果を得た。

1) 混合正規分布モデルを用いた低解像度のタンパク質立体構造の高速あてはめ計算

低分解能の生体超分子像に、要素タンパク質の立体構造を精度よく高速にあてはめるために、混合正規分布モデルを用いたタンパク質立体構造の簡易表現法の構築を開始した。混合正規分布モデルとは、複数の正規分布の線形和で確率分布を近似表現する方法であり、観察点群を出力する尤度最大化により必要なパラメータを推定する。本技法では、原子モデルと三次元画像のそれぞれを混合正規分布モデルで表現する。原子モデルにおいては、原子の位置を



観察点とみなし、電子顕微鏡による三次元画像では、各画素の位置に濃度に比例した観察数があるとみなすことで、期待値最大化アルゴリズムでパラメータの最尤推定を行う。これにより数千原子あるいは、数百万画素が数個から数十個の正規分布で簡潔に表現され、計算を単純化することができる(図1)。原子モデルとそれをばかした三次元画像の人工的なテストデータを用意し、それらを混合正規分布モデルに変換した後、重なりを最大化する並進・回転を最急降下法で計算したところ、良好な結果が高速で得られた。次年度以降はより現実的なデータに対して適用し、本手法の有効性を検証する。

2) 超分子構成要素間界面推定のためのバイオインフォマティクス

低分解能像で判明している超分子立体構造に高分解能で立体構造が判明している構成要素分子をあてはめる場合、分解能に大きな差があるために要素分子の配置を一意的に決定することができない。この問題は、各要素分子の界面をまったく別の情報から推定することで、ある程度克服できると考え、立体構造既知の超分子を収集し、要素分子界面の氨基酸残基特性を調べ、その情報をもとに要素分子間界面の予測を行った。まず、立体構造既知の超分子を収集するデータベース EXOM(Experiment of MacroMolecule)を構築した(図2)。

タンパク質-タンパク質界面及びタンパク質-RNA の界面を推定するにあたり、どのような氨基酸残基が界面に用いられる傾向にあるかを、EXOM に集積したデータより導出した。氨基酸残基の出現頻度解析は今まで多く行われてきているが、本研究では界面にあらわれる氨基酸残基ペアの出現頻度解析をあらたに行い、新規の情報を得ることに成功した。本研究を展開するにあたっては、解析情報が十

PRO ID	Name	Number of atoms	Number of chains	Number of chains having Disordered Protein	Disordered PDB
12000	Rich. Shikik/leuk oligomeric complex	10	6	0	1R8C
12001	Isotonic receptor	8	2	0	1R8C
3-chains of methylthioadenosine phosphorylase from rice					
PRO 01	Name	Number of atoms	Number of chains	Number of chains having Disordered Protein	Disordered PDB
1201	3-chains of methylthioadenosine phosphorylase from rice	6	6	0	1R8C
1202	Crystal structure of 3-chains of methylthioadenosine phosphorylase from rice	6	6	0	1R8C
1203	3-chains of methylthioadenosine phosphorylase from rice	6	6	0	1R8C
A transient interaction between two phosphorylase					
PRO 02	Name	Number of atoms	Number of chains	Number of chains having Disordered Protein	Disordered PDB
1204	A transient interaction between two phosphorylase	8	2	0	1R8C
adjacent a, cell clamp leader complex					
PRO 03	Name	Number of atoms	Number of chains	Number of chains having Disordered Protein	Disordered PDB
1205	Crystal structure of the governing clamp leader	3	1	0	1R8C
1206	adjacent a, cell clamp leader complex	3	1	0	1R8C

図2: 超分子構造データベース EXOM

分多く存在することと、新規計算方法を考案できたこと、の2点が重要であった。本解析結果を界面予測に適用したところ、タンパク質の立体構造情報から、どの部分がRNAとの界面になるかを精度70%程度で予測することができるようになった(論文投稿準備中)。またタンパク質-タンパク質の相互作用部位推定については、現在進行中である。

3) 要素タンパク質の柔らかさを考慮したあてはめ技法の開発

生体超分子の構成過程では、要素分子の構造変化がある程度起こっていることがわかっている。そこで、要素分子の構造変化(柔らかさ)を考慮しながら要素分子構造を低分解能の超分子構造にあてはめる必要がある。本年度はこのあてはめを行う技法を開発した。本技法では、要素分子の立体構造を立体化学的な拘束条件下で、分子動力学シミュレーションの手法を用いて生体超分子の低分解能像にあてはめる。分子動力学シミュレーションを用いているので、物理化学的に可能な範囲の中で構造を変化させることができるようになった。また分子動力学シミュレーション実行時に要素分子立体構造の任意の部分を剛体として扱うことができるようになった。平成18年度には、この手法を用いた要素分子のあてはめを本格的に開始する。

4) 生体超分子構造の電子顕微鏡像測定

生体超分子の構造を電子顕微鏡画像から解析するには、信頼性のある初期構造が必須である。現行の電子顕微鏡イメージング法で最大の弱点であるこの点を補うために、トモグラフィー法を取り入れた解析方法の開発を行い、脳の層構造形成に関わる巨大タンパク質の変異体の構造を解明することで、初期の成功を収めた(論文投稿中)。本方法は、平成18年度におけるデータ取得において大いに力を発揮すると期待される。さらに、DNA複製における生体超分子が関与するクランプはめ込み反応過程をより詳細にとらえることを目的に、クランプローダとDNAの複合体の電子顕微鏡構造解析を行った。その結果、DNAの二重鎖部分の長さに依存してクランプの開き具合が異なることがわかり、クランプローダ複合体がDNAの一重鎖-二重鎖分岐部分を認識してクランプを閉じるメカニズムを解明するための手がかりを得た。平成18年度はチーム内で開発が進んでいる技法を用いて、高分解能のモデルを構築して、複製の分子機構を明らかにすることをめざす。

3. 研究実施体制

生体超分子バイオインフォマティクス研究グループ

①研究分担グループ長: 由良 敬(日本原子力研究開発機構システム計算科学センター、研究副主幹)

②研究項目:

- ・生体超分子像に要素分子像をあてはめる画像フィティング法の開発
- ・要素分子間界面を推定するためのバイオインフォマティクス
- ・要素タンパク質の立体構造を構築するためのホモロジーモデリング法の開発

生体超分子シミュレーション研究グループ

①研究分担グループ長：石田 恒（日本原子力研究開発機構量子ビーム、研究員）

②研究項目：

- ・基準振動解析法による要素タンパク質の構造変化推定
- ・あてはめ構造の精密化のための分子動力学法の開発

生体超分子電子顕微鏡像測定研究グループ

①研究分担グループ長：岩崎 憲治（大阪大学蛋白質研究所、助教授）

②研究項目：

- ・細胞表面の超分子及びDNA複製関連超分子の観測データ取得
- ・測定データへの新規開発手法の適用

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- S.Metsugi, A.Ueyama, J, Aden-kubo, M,Miyashita, K.Yura, H. Kono, N.Go (2005) Sequence analysis of the gliding protein Gli349 in *Mycoplasma mobile*. *BIOPHYSICS*, **1**:33-43.
- T.Miyata, H.Suzuki, T.Oyama, K.Mayanagi, Y.Ishino, K,Morikawa (2005) Open clamp structure in the clamp-loading complex visualized by electron microscopic image analysis, *PNAS*, **102**:13795-800.
- K.Iwasaki, K.Mitsuoka, Y.Fujiyoshi, Y.Fujisawa, M.Kikuchi, K.Sekiguchi, T.Yamada (2005) Electron tomography reveals diverse conformations of integrin α IIb β 3 in the active state, *J. Struct. Biol.* **150**:259-267.