

「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18年度末までに、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、生体超分子を構成する要素分子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推定する手法の開発、および実データとして細胞表面に存在するタンパク質複合体構造とDNA複製装置であるクランプはめ込み用超分子の構造解析を展開することができた。平成19年(最終年)度には、データ測定グループが得る生体超分子像に、バイオインフォマティクスグループの手法で要素分子をあてはめ、シミュレーショングループによる構造精密化を実行し、えられる超分子構造から生物学的に重要な結果を導出することを試みる。

2. 研究実施内容

平成18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

低分解能で得られる生体超分子像三次元画像に、要素分子の高分解能立体構造を精度よく高速にあてはめる手法として、要素分子立体構造を混合正規分布モデルで簡易に表現し、複数の要素分子モデルを生体超分子画像にあてはめるために必要な二種のエネルギー関数を設計し、最適な配置を求めるための計算法の開発を行った。二種のエネルギー関数は生体超分子画像と要素分子モデルの最適重ね合わせを得るためのエネルギー関数($E_{overlap}$)と、複数の要素分子モデルがぶつからないようにするための斥力をつくるエネルギー関数(E_{repuls})である。どちらの関数も二つの正規分布の積の空間積分の和で表現することができる。最適な配置の探索には、これら二つのエネルギーに起因する力 F とトルク T を解析的に導出し、最急降下法を用いた。試験計算として、擬似低分解能画像に二つの要素分子モデルをあてはめたところ、良好な結果を得た。現在、本手法論文の投稿準備中である。平成19年度にはこの手法を低分解能生体超分子画像に適用する。

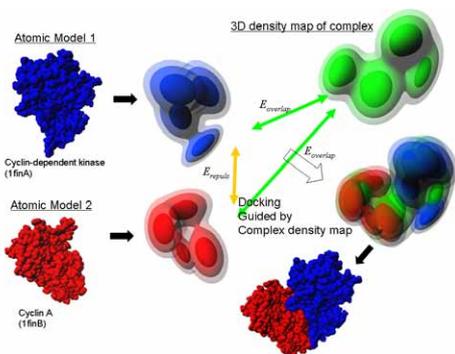


図1: 混合正規分布モデルによる生体超分子画像への様子分子モデルのあてはめ

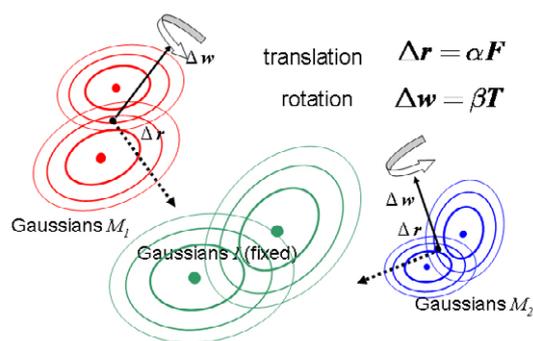


図2: 力 F とトルク T を用いた最適化計算

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

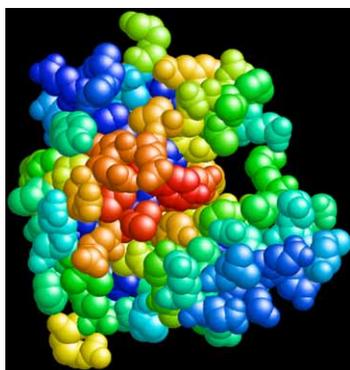


図3: スプライセオゾームの要素タンパク質における推定RNA界面

生体超分子低分解能画像に、要素分子高分解能像をあてはめる際に、要素分子間の相互作用部位をあらかじめ高い精度で推定することができれば、要素分子間の配向の自由度を限定することができる。タンパク質の立体構造情報とゲノム塩基配列情報を用いて、相互作用傾向スコアを導出し、そのスコアを用いてタンパク質のRNA相互作用面を高精度で推定する手法を開発することができた(Kim, Yura, Go, 2006)。生体超分子のひとつであるスプライセオゾームは多くのタンパク質とRNAから構成されており、その一つであるタンパク質P14のRNA相互作用面を推定できた(図3)。平成19年度にはこの情報を用いて低分解能

像へのあてはめを実行する。現在同じ予測方法をタンパク質の DNA 界面予測及びタンパク質間相互作用面予測に拡張中であり、これらも低分解能像へのあてはめに利用する。

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

細胞接着に関与するインテグリンは、活性型と非活性型で構造が変化すると考えられている細胞表面超分子であり、想定非活性型の原子分解能部分構造しかわかっていない。単純化した基準振動解析法を原子分解能構造に適用し、電子顕微鏡画像として得られている想定活性化型に適合する可能性が高い要素タンパク質原子分解能構造を得ることができた。またこの解析を通して、どのアミノ酸残基の相互作用が、タンパク質の構造変化を起こす鍵になっているかを予測することができ、生化学実験により、予測とは矛盾しない結果を得ることができた(論文執筆中)。

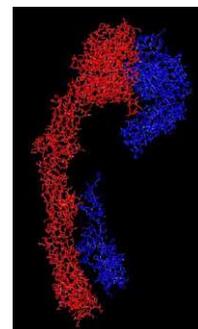


図4:立ち上がったインテグリンの構造

4) 生体超分子構造の電子顕微鏡像測定

インテグリンの想定活性化構造を電子顕微鏡で測定し、低分解能全体画像を得ることを試みた。インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ の単粒子解析を単粒子トモグラフィーの結果をもとに行った。Iドメインのない $\alpha v \beta 3$ インテグリンの構造とIドメインのみの原子分解能構造は早くから報告されている。Iドメインは情報伝達機能に取って重要なドメインなので、電子顕微鏡測定によってその位置を突き止めることができた。まず、二次元平均化画像によってIドメインの位置を特定し(図5)、 $\alpha 2 \beta 1$ 活性化抗体である TS2-16 を加え、単粒子トモグラフィーを行った(図6)。このトモグラムのうちのの一つを初期構造として単粒子解析を行い、各々のドメインを手動で当てはめることができた(図7)。平成 19 年度には氷包埋した試料の単粒子解析と組み合わせて、バイオインフォマティクス研究グループの開発するあてはめプログラムに耐えうる分解能をもった画像測定解析を行う。

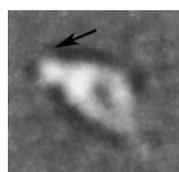


図5: インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ の二次元平均化画像。矢印で示した部分が I ドメイン



図6: インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ のトモグラム

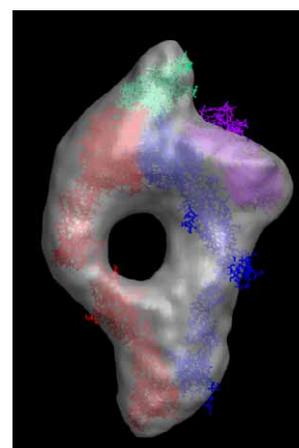


図7: 単粒子解析から得られた三次元再構成像に各ドメインと抗体 Fab フラグメントの原子座標をあてはめた

3. 研究実施体制

(1)「生体超分子バイオインフォマティクス研究」グループ

①研究者名

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)

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

(2)「生体超分子シミュレーション研究」グループ

①研究者名

石田 恒((独)日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門 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

(3)「生体超分子電子顕微鏡像測定研究」グループ

①研究者名

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- O. T. P. Kim, K. Yura and N. Go (2006) Amino acid residue doublet propensity in the protein-RNA interface and its application to RNA interface prediction, *Nucl. Acids Res.*, **34**, 6450-6460.
- J.Takeda, Y.Suzuki, M. Nakao, R. A. Barrero, K.O. Koyanagi, L. Jin, C. Motono, H. Hata, T.Isogai, K. Nagai, T. Otsuki, V. Kuryshev, M. Shionyu, K. Yura, M. Go, J. Thierry-Mieg, D. Thierry-Mieg, S. Wiemann, N. Nomura, S. Sugano, T. Gojobori and T. Imanishi (2006) Large-scale identification and characterization of alternative splicing variants of human gene transcripts using 56,419 completely sequenced and manually annotated full-length cDNAs, *Nucl.Acids Res.*, **34**, 3917-3928.
- K. Iwasaki (2006) Single particle analysis and electron tomography. *Int. J. Nanotechnology*, **3**, 480-491.

- T.Nogi, N.Yasui, M.Hattori, K.Iwasaki and J.Takagi (2006) Structure of a signaling-competent reelin fragment revealed by X-ray crystallography and electron tomography. *EMBO J.*, **25**, 3675-683.
- Y. Yonetani (2006) Liquid water simulation: A critical examination of cutoff length, *J.Chem. Phys.*, **124**, 204501.
- Y. Yonetani, H. Kono, S. Fujii, A. Sarai and N.Go (2007) DNA deformability and hydration studied by molecular dynamics simulation, *Mol. Sim.*, **33**, 103-107.