

## ブラウン動力学計算から得られるタンパク質の揺らぎ情報の活用

(北里大学薬学部) ○山乙 教之、鈴木 賢志、広野 修一

## はじめに

タンパク質上の単なる窪みと結合サイトとの違いは、どこにあるのか？ 我々は、リガンドの結合サイトは、タンパク質上の他の窪みよりも疎水性が高いと考え、経験的疎水性ポテンシャル<sup>1)</sup>に基づく結合サイト探索プログラム HBOP を開発した<sup>2,3)</sup>。そして、タンパク質-リガンド複合体 X 線構造のあるタンパク質 26 種（複合体構造 72 個）において検証した結果、結合サイトを 100% 検出できた。しかしながら、HBOP で真の結合サイトを含む複数の疎水性サイトが検出された場合に、U1A Protein のように、疎水性の最も強いサイトが結合サイトでないタンパク質もあることがわかった。結果として、約 92% のリガンドが、最も疎水的な領域に結合していることを示せたが、複数検出された場合には、結合サイトを 1 つにまで絞り込むことはできなかった。

一般に、リガンド（鍵）が、タンパク質の結合サイト（鍵穴）に結合する際に、多かれ（主鎖レベル）少なかれ（側鎖レベル）、結合サイトの induced fit が起きると考えられている。そこで、この動的柔軟性が、結合サイトのもう 1 つの特徴でないかと考え、タンパク質のリガンドが結合していない状態の X 線構造にブラウン動力学法を適用して、結合サイトとその他の疎水性サイトの動的揺らぎを測定した。

## 方法

## タンパク質検証セット

表 1 に、検証に用いたタンパク質のリガンド非結合時、結合時、それぞれの PDB ID を示した。Induced fit が大きなタンパク質 2 種、U1A Protein と Protein-Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B)、小さなタンパク質 2 種、β-Tripsin と Neuraminidase、の計 4 種を検証に用いた。結合サイトを構成するアミノ酸残基の N、C<sub>α</sub>、C<sub>β</sub>、C、O 原子を用いて測定した rmsd 値も併せて表に示す。

表 1 タンパク質検証セット

Protein	PDB ID		rmsd (Å)
	Free	Bind	
U1A Protein	1FHT	1URN	5.465
PTP1B	2HNP	1C85	2.771
β-Tripsin	2PTN	3PTB	0.395
Neuraminidase	1NN2	2BAT	0.392

## HBOP による疎水性サイトの検出

4 種類のタンパク質について、リガンド非結合時の X 線構造の周り 10 Å に、1 Å 間隔で格子点を発生させ、各点における疎水性ポテンシャルエネルギー<sup>1)</sup>（式 1）を計算した。

$$\Delta G_H = -2.0 R e^{-D/10} \cdots \quad (1)$$

ここで、 $\Delta G_H$  は、疎水性ポテンシャルエネルギー (kcal/mol)。 $R = R_1 R_2 / (R_1 + R_2)$ 、 $R_1$  は、タンパ

ク質中の炭素原子の半径、 $R_2$ は、格子点上のプローブ炭素原子の半径。 $D=R_{12}-(R_1+R_2)$ 、 $R_{12}$ は、タンパク質中の炭素原子と格子点間の距離。計算には、タンパク質中の疎水性残基（Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Trp, Phe, Pro）のカルボニル炭素を除く炭素原子を用いた<sup>4)</sup>。そして、最も疎水性の強い領域をリガンド結合サイトとして同定した（式2）。

$$\Delta G_H^{\min} \leq \Delta G_H \leq (0.7\Delta G_H^{\min} + 0.3\Delta G_H^{\max}) \cdots (2)$$

ここで、 $\Delta G_H^{\min}$ は、最小疎水性ポテンシャルエネルギー値、 $\Delta G_H^{\max}$ は、最大疎水性ポテンシャルエネルギー値。HBOPにより検出された疎水性サイトの格子点から4Å以内のアミノ酸残基を結合サイトの候補として定義した。

### ブラウン動力学法による平衡アンサンブルの生成

溶液中でブラウン運動する粒子の運動は、ランジュバン方程式（式3）によって記述される。

$$m \frac{d\mathbf{v}}{dt} = \mathbf{F} - m\zeta\mathbf{v} + \mathbf{F}^B \cdots (3)$$

ここで、 $m$ は、粒子の質量、 $\mathbf{v}$ は、速度、 $t$ は、時間、 $\mathbf{F}$ は、相互作用力、 $m\zeta$ は、摩擦係数、 $\mathbf{F}^B$ は、ランダム力である。 $\zeta$ は、ストークスの法則から、(4)式で導かれる。

$$\zeta = 6\pi\eta a/m \cdots (4)$$

ここで、 $\eta$ は、粘度、 $a$ は、粒子半径である。

我々は、ブラウン動力学法のためのアルゴリズムとして、ErmakとBuckholzの式を採用した<sup>5,6)</sup>。

各タンパク質のX線構造を初期構造として、ブラウン動力学法プログラム brownian<sup>7-10)</sup>を用

いて、1 ns ブラウン動力学法を行い平衡化し、構造アンサンブルを得た。

### 回転楕円体近似による結合サイトの特徴抽出

HBOPより検出された候補結合サイトを構成するアミノ酸残基の重原子の座標に関して主成分分析を行い、得られた3つの主成分（長軸、中軸、短軸）を用いて、アミノ酸残基の空間的配置を回転楕円体近似した（図1）。ブラウン動力学法により得られた構造アンサンブルについて、各候補結合サイトの動的揺らぎの指標として、回転楕円体体積の平均と標準偏差を求めた。そして、体積変動の大きさ（回転楕円体体積の標準偏差）を真の結合サイトと、検出された他のサイトとで比較した。

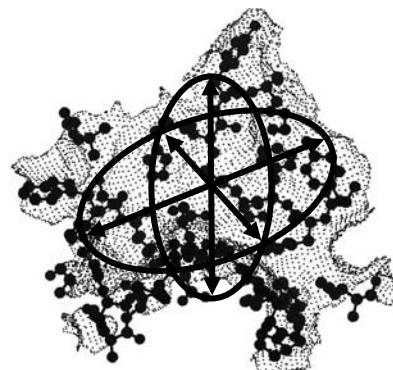


図1 サイトを構成するアミノ酸残基（Ball & Stick）とその配置の回転楕円体近似（太線）。点線は、タンパク質表面。

### 結果と考察

#### HBOPにより検出された疎水性サイト

4種類のタンパク質のリガンド非結合時のX線構造について、HBOPプログラムを用いて、疎水性サイトを検出したところ、いずれも真の結合サイトを含む複数の疎水性サイトを検出した（図2）。Neuraminidase、β-Tripsin、Protein-Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B)については、疎水性の最も高いサイトが、結合サイトであった（図2b～d）。しかしながら、U1A Protein

については、3番目の疎水性サイトが、結合サイトであった（図2a）。

### 結合サイトの特徴

表2に示すように、4種類のタンパク質全で、トラジェクトリ中の結合サイトの体積変動が、他の疎水性サイトに比べて大きかった。これは、結合サイトが、他のサイトと比べて、揺らいでいることを意味している。

表2 各タンパク質のトラジェクトリ中における疎水性サイトの体積変動

Protein	Site	Volume ( $\text{\AA}^3$ )	
U1A Protein	1	1041.8	$\pm 39.5$
	2	863.4	$\pm 71.2$
	3	710.1	$\pm 73.4$
	4	587.5	$\pm 32.5$
PTP1B	1	1232.1	$\pm 97.0$
	2	1152.2	$\pm 54.6$
	3	897.0	$\pm 63.3$
$\beta$ -Tripsin	1	1488.4	$\pm 59.1$
	2	868.4	$\pm 47.6$
	3	838.3	$\pm 56.5$
Neuraminidase	1	1770.1	$\pm 107.0$
	2	1692.3	$\pm 105.8$

枠線は、結合サイト。

U1A Protein や PTP1B のように、induced fit が起きるタンパク質において、リガンドフリーの状態で、結合サイトが元々揺らいでいるのは、きわめて妥当である。しかし、induced fit のあまり起きていない Neuraminidase や  $\beta$ -Tripsinにおいても、結合サイトが他の疎水性サイトよりも揺らいでいるという結果は、一見矛盾しているように思われる。

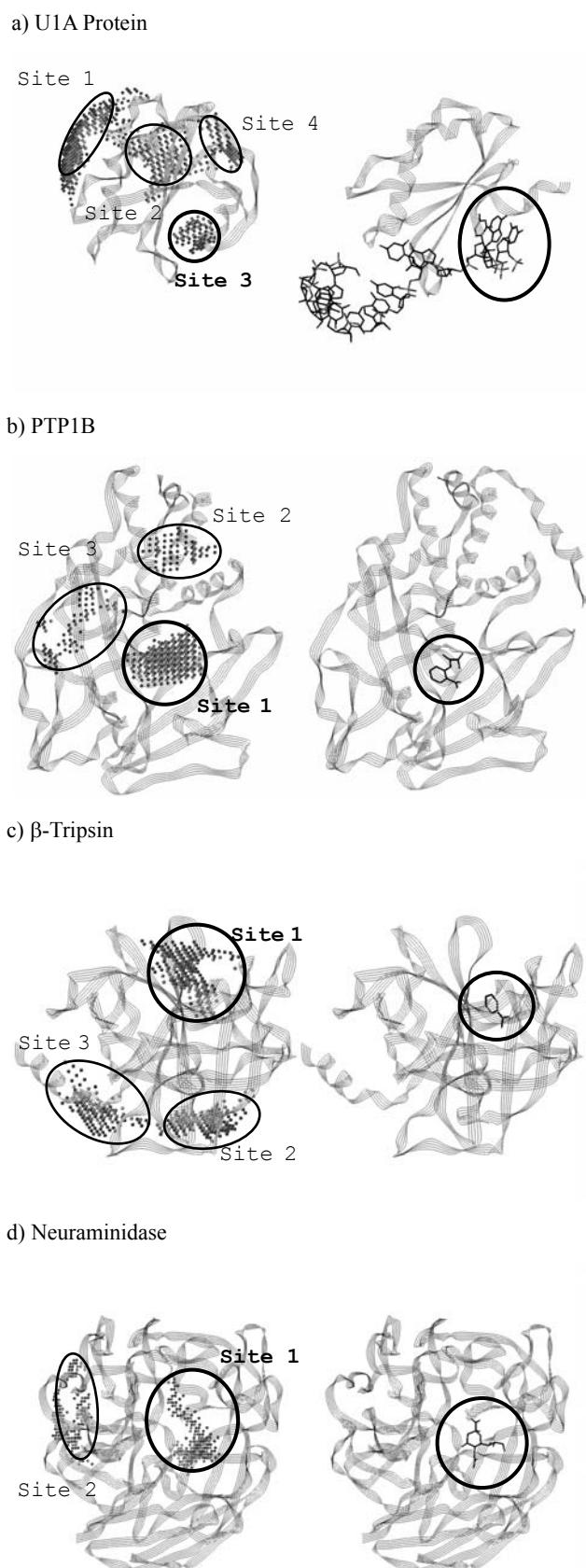


図2 タンパク質単独のX線構造で検出された疎水性サイト（左）と複合体X構造（右）。番号は、疎水性の強さの順序を表している。

しかしながら、次のように考えることで統一的な解釈が可能である。酵素の場合、反応物である基質をしっかりとキャッチし、遷移状態に構造変化して触媒反応を進め、最後に生成物をスムーズにリリースするためには、タンパク質に動的柔軟性がなければならない。また、受容体であれば、シグナル伝達を起こすために、タンパク質の構造変化が必要であろう。従って、この動的柔軟性は、タンパク質のリガンド結合サイト固有の性質であると考えられる。

## 結論

Induced fit の大きなタンパク質 2 種、小さなタンパク質 2 種の合計 4 種類のタンパク質について、結合サイトの揺らぎを他のサイトと比較した結果、全てのタンパク質で、結合サイトは他に比べて大きく揺らいでいた。このことから、動的柔軟性が、リガンド結合サイトの重要な特徴であると思われる。

従って、疎水性によるサイト探索法とこの動的柔軟性の 2 つの指標を用いることで、ほぼ確実にタンパク質上のリガンド結合部位を同定することが可能となると考えられる。

## References

- [1] J.Israelachvili & R.Pashley, *Nature*, **300**, 341-342 (1982).
- [2] 山乙教之 & 広野修一, 「第 3 回情報計算化学生物学会大会論文集」, 140-141 (2002).
- [3] 山乙教之 & 広野修一, 「第 30 回構造活性相関シンポジウム 講演要旨集」, 27-30 (2002).
- [4] H.Gouda, N.Yamaotsu, K.Yamazaki & S.Hirono, in Peptide Chemistry 1996 (ed. C.Kitada) 361-364, Protein Research Foundation, Osaka, (1997).
- [5] D.L.Ermak & H.Buckholz, *J. Comput. Phys.*, **35**, 169-182 (1980).
- [6] 神山新一 & 佐藤明, 「流体ミクロ・シミュレーション」(分子シミュレーション講座 3), 朝倉書店 (1997).
- [7] 山乙教之 & 広野修一, 「情報計算化学生物学会 2003 年大会予稿集」, 184-185 (2003).
- [8] 山乙教之 & 広野修一, 「第 31 回構造活性相関シンポジウム 講演要旨集」, 115-118 (2003).
- [9] 山乙教之 & 広野修一, *SAR News*, **6**, 18-20 (2004).
- [10] 山乙教之, 加倉井隆一 & 広野修一, 「情報計算化学生物学会 2004 年大会予稿集」, 77-78 (2004).