

# 蛋白質相互作用の定量的解析をめざして

## 水和情報を取り入れた蛋白質相互作用解析法の確立

研究者 伊倉 貞吉  
東京医科歯科大学

### 概要

低温 X 線結晶構造解析と計算機シミュレーションを主な手段として、蛋白質の結合・解離に伴う水和水の挙動を実験的かつ理論的に解析し、水分子を介した相互作用を解明した。さらに、この水和情報を取り入れた蛋白質相互作用解析法を確立した。

### 1. はじめに

蛋白質-蛋白質相互作用は、蛋白質の機能発現に必須の過程であり、その相互作用機構の解明は生物化学をはじめ周辺領域においても重要な問題となってきた。蛋白質のほとんどは細胞質等の水溶液中で機能するので、一般の分子やイオンなどと同様に常に水和しており、蛋白質間の相互作用もまた少なからず水和の影響を受けている。そこで、本研究では、このように蛋白質の機能に深く関わる水和に注目し、蛋白質間の相互作用における水和水の挙動を実験と計算機シミュレーションにより解析し、水和水を仲立ちとした蛋白質間の相互作用を解明することを目指している。また、水和情報を積極的に活用することにより、これまで定性的な議論しかできなかった相互作用予測法を、定量的な評価が可能なものへと発展できるのではないかと考え、そのための方法論の開発を行っている。

### 2. 蛋白質の水和水の挙動

近年、蛋白質の水和の重要性に関心が集まり、蛋白質分子表面の水和水の分布（水和サイト）の特徴を調べた研究が国内外で報告されている。実験的に水和サイトを決定するための最も有効な方法は低温 X 線結晶構造解析法であり、結晶中での分子接触によるアーティファクトはあるものの、弱い相互作用を持つ水和サイトまでもオングストローム分解能で検出することができる。しかしながら、低温 X 線結晶構造解析法から水和水のダイナミクスに関する情報はほとんど得ることはできないので、水和水のダイナミクスまで解析するためには計算機シミュレーションなどに頼らなければならない。

ダイナミクスも取り入れて蛋白質の水和を解析するには、水和した側鎖の大きな運動までも考慮する必要がある。従来の「(静的な) 水和サイト」の概念では水和を捉えきれない。そこで、本研究では、新たに「相互作用ペア」という概念を導入した。これは、蛋白質の官能基と水和水分子とが相互作用している時に、その両者からなる「相互作用ペア」が形成されたと考え、「相互作用ペア」が、蛋白質表面にどのように分布するのかということと、どのくらいの時間だけ持続するのかということの2点を指標に蛋白質の水和を捉える方法である。

本研究は、まず、X線結晶構造解析によって決定される水和水の位置が、蛋白質の物性のみを反映し一意的に決まるものなのか、それとも、結晶化条件などの環境因子からの影響でたまたま決まっただけなのかを検証することから始めた。このために、Protein Data Bank (PDB) に登録された高分解能な構造データを利用して、結晶化条件の違いにともなう水和水分布の変化の解析を行った。T4 リゾチームは、単一蛋白質としては最多の 324 個の結晶構造が PDB に登録されており、結晶化条件も結晶系も多岐にわたっているため、この解析には最適な例であった。324 個の構造のうち水分子を多く含むデータ 308 個を用いて解析を行ったところ、97%(300 個)以上の構造で共通に存在する相互作用ペアが 5 個、32%(100 個)以上で共通のものは 123 個にも上った。これらのことは、X線結晶構造解析から決まる蛋白質の水和水の位置が、蛋白質の分子表面の物性を反映していることを示している。

次に、水和水のダイナミクスを、分子動力学シミュレーションにより解析した。水分子 8323 個の立方体状のセル中に 1 個の T4 リゾチームを浸し、周期境界条件の下 AMBER7 を用いて 1 気圧 300K での 1ns の各分子の軌跡を解析した。相互作用ペアには、1ns 以上も維持されるようなものから、1ps にも満たないものまで存在した。その差は、相互作用ペアが存在する部位に特異的であって、PDB データの解析において高頻度で存在していた相互作用ペアの 70%は、シミュレーションでも 30%(300ps) 以上の持続時間をもつものとして特徴づけられた(図 1)。一方、残りの 30%の相互作用ペアは、ほとんどが結晶中での分子接触面かその近傍にあり、結晶化に伴い安定化された相互作用であった。

これら 2 つの解析から、蛋白質の分子表面には安定な水和水を形成する特異的な部位が存在することが明らかになった。また、X線結晶構造解析で検出された水和水は、比較的長時間の相互作用ペアを形成する水和水であること、結晶中の分子接触面にある水和水についてはその限りではないことがわかった。

蛋白質-蛋白質相互作用における水和水の顕著な挙動は、相互作用界面での脱水和である。そこで、脱水和の分子動力学シミュレーションも行った。ここでは、水和層を二層分含む T4 リゾチームを水分子の 5 倍の個数に相当するメタノール分子中に漬けて、1ns 間の脱水和現象を観測した。結果は 1ns 後にも約半分の水分子は水和水のままであり、また、脱水和と水和水はほぼ平衡状態に達していた。蛋白質-蛋白質相互作用の界面や結晶中の分子接触面に水分子が存在するのは、このシミュレーションと同様な現象であると考えられる。

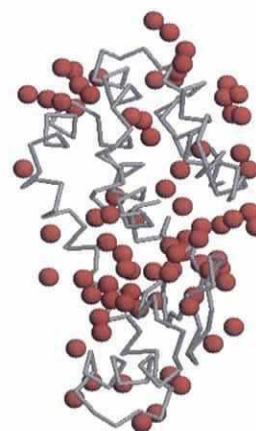


図 1. T4 リゾチームの水和水の分布。PDB データ解析と計算機シミュレーションとで共通に検出された水和水を赤丸で示した。

### 3. 蛋白質-蛋白質相互作用における水和水と脱水和

次の段階として、蛋白質間の相互作用にともなう水和水と脱水和を解析した。モデル系には、蛋白質分子間の相互作用研究で実験的かつ理論的に幅広く利用されているバルナーゼ-バルスター系を取り上げた。バルナーゼはバチルス的一种 *Bacillus amyloliquefaciens* の RNA 分解酵素であり、自らの細胞内での活性阻害蛋白質がバルスターであって、両者は極めて高い親和性をもって結合することが知られている。すでに X線結晶構造解析法により決定されている個々の蛋白質及び複合体の立体構造によれば、両蛋白質とも複合体形成の前後でほとんど構造変化しないので、水和水状態の変化だけを解析する

のに最適な系である。本研究では、バルナーゼとバルスターの単量体及び複合体のそれぞれについて、水中での分子動力学シミュレーションを行い、複合体形成に伴う水和水の挙動の変化を解析した(図2)。その結果、結合界面での脱水和はわずか35%の水和水に対してしか見られず、また、複合体形成によって単量体の時よりも安定化された水和水も多数存在することがわかった。これらの水和水は水素結合のネットワークによって蛋白質間の相互作用の仲介していた。このような水分子の多くは、蛋白質間の直接的な相互作用部位の周辺に分布していた。これらは、蛋白質-蛋白質相互作用が、蛋白質間の直接的な相互作用と、水和水分子を介した間接的な相互作用とによって構成されていることを示している。

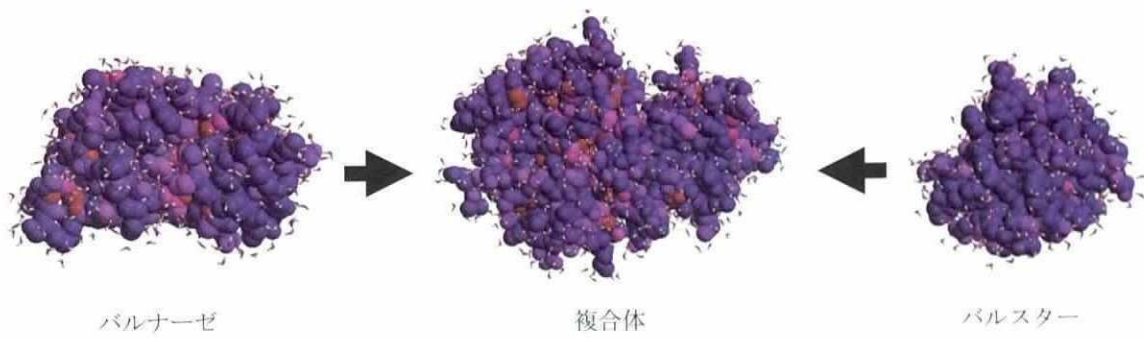


図2. バルナーゼ-バルスター系を用いた蛋白質間の相互作用にともなう水和水と脱水和の解析。より長時間持続する「相互作用ペア」を暖色(蛋白質側のみを着色)で表現した。複合体形成によって、相互作用界面内の水和水が安定化している。

#### 4. 相互作用の自由エネルギーに対する水和水の寄与

蛋白質-蛋白質相互作用を解析するには、直接的な相互作用と間接的な相互作用との両方を考慮する必要があることがはっきりしたので、それぞれの相互作用の寄与の程度を実験的に見積もった。ここでもまた、多くの利点からバルナーゼ-バルスターの系を用いた。相互作用界面に変異を導入することによって相互作用界面内の水和水を変化させるとともに、変異による相互作用変化を表面プラズモン共鳴法で、また、変異体の複合体構造をX線結晶構造解析によりそれぞれ決定した。変異部位には、バルナーゼとの結合界面にあるバルスターの4つのアミノ酸残基(D35、D39、E76、E80)を選び、それぞれをアラニンに置換した。全15種類の変異体と野生型のバルスターについて表面プラズモン共鳴法

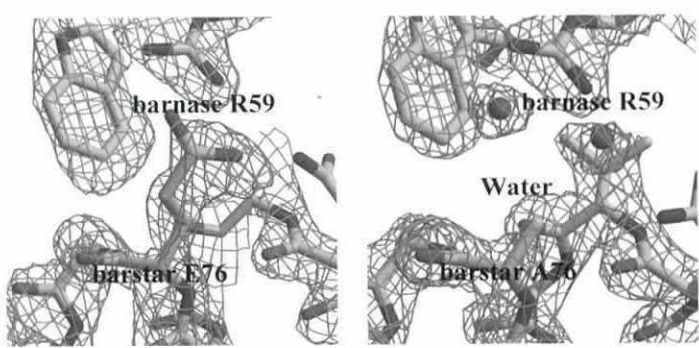


図3. 結合界面にあるアミノ酸残基の変異に伴う水和水構造の変化。左は、野生型同士、右は野生型バルナーゼとバルスターE76A。

により結合及び解離の速度論的解析を行ったところ結合と解離とで異なる影響が観測された。一方、結晶構造はバルスターの WT と 3 種類の単一変異体 D35A、E76A、E80A に関する複合体について決定した(図 3)。4 種類の複合体構造とも全体構造はほとんど同じであり、違いは変異箇所にも局在化していた。また、変異箇所周辺の水和の相互作用ペアにも変化が観測された。これらの実験データに基づきバルナーゼとバルスターとの相互作用を考えると、相互作用に対する寄与の大きな因子として蛋白質間の直接的な相互作用(X)、水和水を介した間接的な相互作用(Y)、水分子の相互作用界面内への侵入或いは排除の効果(Z)の 3 種類に大別することができた。結果として、簡単な計算から、一個の相互作用あたり  $X=2.5$  kcal/mol、 $Y=1.0$  kcal/mol、また、一個の水分子の侵入に対して  $Z=-0.5$  kcal/mol、それぞれ相互作用の自由エネルギーを大きくする(結合を安定化する)ことがわかった。水和水を介した間接的な相互作用が、蛋白質間の直接的な相互作用の約半分の寄与を与えるということは、水和水を介した間接的な相互作用を決して無視することができないことを示している。

## 5. 蛋白質相互作用の定量的予測法の開発(応用例)

理想的には、上で決定したパラメータを用いれば任意の構造既知の蛋白質同士の組み合わせに対して、相互作用の自由エネルギー変化を予測できるはずである。しかし、複合体形成の前後での構造変化や、複合体形成時の分子同士の配向と相互作用ペアを予測することが困難なことなど、まだまだ現段階では問題が多い。そこで、第一段階として、「既に相互作用をすることが知られている 2 つの蛋白質に対して、アミノ酸の変異に伴って相互作用がどの程度変化するかを定量的に予測する」という問いに対する回答を得ることを目標に方法論の開発を行った。

モデル系には、引き続きバルナーゼ-バルスター系を用いて、結晶構造未知のバルスターの変異体 D39A とバルナーゼとの複合体の水和構造を予測するとともに、その予測構造に基づき WT に対する相互作用自由エネルギー変化を求めた。その結果、バルスター-D39A の場合は、直接的相互作用が 4 個減り、間接的相互作用が 4 個増え、1 個の水分子が侵入したので、 $-6.5$  kcal/mol と計算された。この値は、表面プラズモン共鳴法で求めた実験値 $-6.0$  kcal/mol と 10%以内の差で一致しており、本方法論の実用性が期待できることを示している。最近、バルスター-D39A の複合体の結晶構造を決定することができ、分子動力学シミュレーションの予測構造が実際の構造とよく一致していることが実証された。

## 6. おわりに

蛋白質-蛋白質相互作用において、これまで重要性が認識されながらも解析の困難さゆえに、ほとんど手をつけられていなかった水和の寄与を、本研究では、限定された環境下ながらも定量化することに成功した。今後のさらなる研究により、より一般的な事例へと適用できるかたちに発展させていきたいと考えている。

## 謝辞

本研究の遂行にあたりご協力を賜った以下の方々に感謝申し上げます: 桑島邦博教授(東京大学)、中迫雅由助教授(慶應大学)、A.R.Fersht 教授(ケンブリッジ大学)、伊藤暢聡教授(東京医科歯科大)

学)、浦久保良昭さん(東京医科歯科大学)、長谷川智一さん(株式会社リガク)、与座健治博士(株式会社プルカー・エイエックスエス)。

#### 発表リスト

結晶構造: バルナーゼの単量体 (1 件)、バルナーゼ-バルスター複合体 (5 件)

原著論文: Chemical Physics 誌 (1 件)

学会発表: 国内学会 (5 件)、国際学会 (3 件)