

三次元構造マッチングを用いたペプチド立体構造探索手法の構築

小松 大和[†] 千葉 直也[‡] 橋本 浩一[‡]

東京大学大学院 理学系研究科[†]

東北大学大学院 情報科学研究科[‡]

1. はじめに

ペプチドは構成するアミノ酸の配列によって非常に多様な立体構造を取り、様々な性質を発現する。そのため、多様なペプチドライブラリから目的の性質を持つペプチドを探索する研究が行われてきた。しかし、化学反応に伴う効率等の問題から、物理的・時間的制約が生じていた。本研究ではシミュレーションにより擬似的に生成したペプチドと探索対象の立体構造間で、三次元点群ベースの物体検出に用いられている三次元構造マッチング手法を応用することで、上記の制約を受けずにペプチドを探索する方法論を目指した。具体的目標として、未だ発見されていない「酵素活性を持つペプチド」の探索を行った。本発表ではその方法論構築の経過について報告する。

2. 生物学的背景

酵素は生体内という限られた条件で数多くの反応を触媒する非常に優れた生体触媒である。その触媒機能は、活性部位と呼ばれる限られた空間の適切な位置に、反応に必要なアミノ酸残基や基質を巧妙に配置・捕縛することで発現する。この活性部位の立体配置は非常に厳密に決まっており、その厳密な立体構造を実現するために、酵素のほとんどは非常に巨大なタンパク質である。しかしそれらタンパク質酵素の起源は謎に包まれている。原始地球で考えられるアミノ酸鎖は長くとも 30 アミノ酸残基程度とされており¹、しかし、現存するタンパク質酵素は最小のものでも 62 アミノ酸残基という大きさであり²。原始生物が巨大なタンパク質酵素を持っていたとは考えがたい。そこで我々は巨大なタンパク質酵素が出現する前に、短いアミノ酸鎖であるペプチドが酵素として機能していたののではないか、という仮説を立てた。

この仮説を立証する手立ての一つとして本研究では「酵素活性を持つペプチド」の探索を試みる。具体的には、原始生物に必須だと考えら

れるアルコールの酸化反応を触媒するペプチド酵素の探求に挑む。研究分担者の小松の属する菅研究室では、ペプチド中に非天然アミノ酸を導入した上で網羅的スクリーニングを行うことのできる RaPID システム (Random non-standard Peptide Integrated Discovery System) が確立されている。この手法により大環状ペプチドという、酵素活性を持ちうるほど複雑な構造を持つペプチドライブラリ及び、「触媒活性」という従来なされていなかった性質によるスクリーニング系の構築が可能となった。しかし、実際の合成・選別実験に伴う物理的・時間的制限により未だペプチド酵素の発見には至っていない。

3. 提案法概要

本研究はタンパク質酵素の活性部位の三次元モデルと、分子動力学シミュレーションで生成したペプチドの三次元形状の間でマッチングを行い、三次元的な形状の一致度にスコアを与える。このスコア上位に対して実際に化学的実験を行うことで、化学的探索よりも大規模にペプチザイムの探索を行うためのプロセスを構築する。提案するプロセスを以下に示す。

A) タンパク質酵素の活性部位の特定

生化学的な知見に基づき、手動でアルコール脱水素酵素の活性部位から、反応に必要なと考えられる元素を選択・抽出した。

B) ランダムなアミノ酸配列部分を有するペプチドの生成

合成可能なペプチドの雛形を作成し、一部のアミノ酸配列をランダムに設定した。

C) 生成されたペプチドの三次元構造予測

生成されたペプチドについて、OpenBabel 及び Spartan を用いて分子動力学シミュレーションを行い、三次元形状を推定した。まず OpenBabel を用いた初期値計算を行い、次に Spartan によって構造予測を行う。MMFF 力場を使用し、実験条件を考慮して水中の溶媒効果を指定した。

D) 生成されたペプチドと酵素活性部位のマッチングスコアの算出

三次元点群処理に関する知見をもとに、三次元 ICP(Iterative Closest Point)[3]の残差に

The 3D matching based discovering method for the conformational space of peptides

[†]Graduate School of Science, The University of Tokyo

[‡]Graduate School of Information Science, Tohoku University

よる評価を利用した[4-6]. ペプチドは複数の元素から構成されるため、元素ごとに同種の最近傍元素との距離を最小化するように ICP アルゴリズムを拡張した. この ICP における残差をマッチングスコアとした.

E) マッチングスコア上位のペプチドに対するアッセイ

酵素活性の有無を, RaPID システムを応用することで検証した. RaPID システムはタンパク質が固定されたビーズによるペプチドの回収率を測定することで, そのペプチドが目的の性質を有するか検証することができる. 今回はアルデヒドに特異的に反応する試薬を用いて, アッセイ系を構築した. 別途用意したアルコールあるいはアルデヒドのみを持つペプチド群の回収率と比較することで, 得られたペプチドが酵素活性を持つか検証を試みた.

4. 実験

提案する探索プロセスにより, 「アルコールからアルデヒドへの酸化」活性を持つペプチド酵素(ADH)の探索を行った. 単環構造のペプチド(図 1) 及び三環構造のペプチド(図 2) について実験を実施した. ただしアッセイ系の都合により, アッセイは単環構造のペプチドに対してのみ実施した.

単環構造のペプチドについて 1750 個, 三環構造のペプチドについて 1050 個のマッチングスコアを計算した. 得られたスコアのヒストグラムを図 2 に示した. さらに単環構造のペプチドのマッチングスコア上位 5 個について, アッセイを行った. その結果, このアッセイ方法で検出できる程高い活性を持つペプチド酵素の発見には至らなかった.

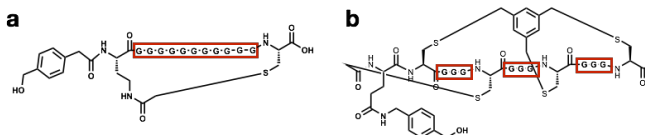


図 1 シミュレーションによって生成したペプチドの骨格構造. (a) 単環構造のペプチド (b)三環構造のペプチド. それぞれ図中赤枠部にランダムなアミノ酸配列を導入し, 疑似的なペプチドライブラリを生成した.

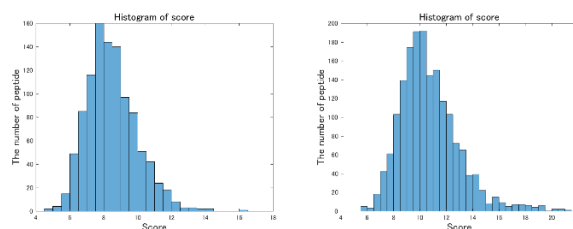


図 2 マッチングスコアのヒストグラム. (左) 単環構造のペプチド. (右) 三環構造のペプチド.

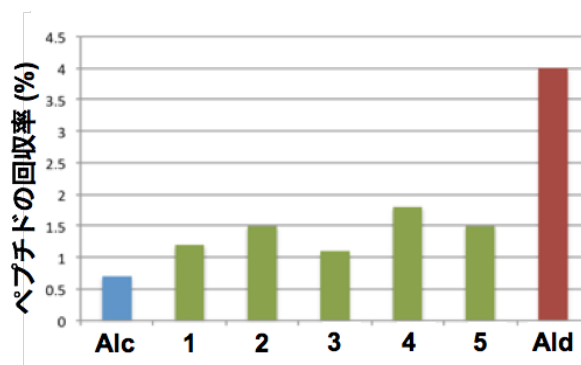


図 3 アッセイの結果. (Alc) 酵素反応を起こさずに回収したもの. 酵素活性がなくとも Back ground として回収されるペプチドの量を表す. (1-5) マッチングの結果得られたペプチド上位 5 位. (Ald) 化学合成により全てアルデヒド基を持つペプチド. 酵素活性が 100 %の効率でアルコールを酸化した場合の指標になる.

5. おわりに

本研究では三次元構造マッチングによるペプチド探索を行うためのプロセスを構築した. 三次元構造がどれだけ離れているかを示すマッチングスコアを計算することで, 計算機による探索手法を構築した. 本研究ではペプチド酵素の発見には至らなかったため, 今後は引き続き探索と探索手法の改善を行う.

謝辞

本研究は東北大学大学院情報科学研究科 学生プロジェクトによる助成を受けたものです.

参考文献

[1] Ferris J. P. et al, Nature, 1996, 381, 59-61.
 [2] L. H. Chen et al., J. Biol. Chem., 1992, 267, 17716-17721.
 [3] P. J. Besl, N. D. McKay. A Method for Registration of 3-D Shapes, IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell., 1992.
 [4] 寺島由杜, 荒井翔悟, 橋本浩一. 形状特徴の少ない工業部品の 3次元点群全周モデル作成. ROBOMECH2016, 2016.
 [5] 福地伸晃, 荒井翔悟, 橋本浩一. FASt Detection Algorithm for 3DKeypoints(FADA-3D). サステナブル/ロボティック・システム・デザイン研究会, 2015.
 [6] 荒井翔悟, 千葉直也, 福地伸晃, 橋本浩一. 3D Keypoint 対応付けの高精度化に関する検討. ROBOMECH2015, 2015.