

## 研究課題別評価

1 研究課題名:新規機能創製を目指した酵素蛋白質の立体構造・触媒機構の系統的解析

2 研究者氏名:長野 希美

3 研究の狙い:

従来の酵素の分類法では、酵素蛋白質の立体構造や触媒機構を考慮しているものが殆ど存在していなかった。そこで、酵素の機能である触媒機構を反応のタイプ、各反応ステップや酵素・補酵素・基質・産物の立体構造に基づいて系統的に解析・分類し、データベース化することを狙いとした。また、酵素の新規機能を開発することを目指すために、立体化学を考慮した触媒機構を可視化することも狙いとした。

4 研究成果:

(1)酵素触媒機構の系統的解析

酵素の立体構造、リガンドの化学構造、酵素とリガンドの相互作用など様々な角度から酵素の触媒機構を詳細に理解することから、その酵素に特有な阻害剤・活性化剤などをデザインすることが可能となると考えられる。

しかしながら、酵素に関わる情報学はまだ十分に整理されているとは言えない。従来の酵素の分類である酵素番号は、主に基質・産物の化学構造や触媒反応に関わる補酵素などに基づいて分類が行われており、触媒機構において重要であるタンパク質の配列情報や立体構造に関する情報が全く考慮されていない。例えば、異なるフォールドやスーパーファミリーに属する酵素でも、類似の反応を触媒することもある反面、同じ配列ファミリーに属する酵素でも異なる戦略で触媒機能を担うこともある。酵素番号は、そのような詳細な触媒機構を反映した分類法ではない。また、酵素によっては、1種類の反応だけでなく、複数の基本反応を組み合わせた複雑な反応を触媒することもあるが、そのような場合、一つの酵素番号だけで触媒機構を表現するのは困難である。

他方で、蛋白質の立体構造のデータは、現在、Protein Data Bank (PDB) に2万エントリー以上、登録されている。このうち酵素の立体構造データには、蛋白質のみならず、基質・産物・補酵素や反応中間体、あるいはそのアナログ化合物や遷移状態のアナログなど重要なリガンド情報も多数含まれており、PDB そのものが、創薬を行う際の、リード化合物に関する有用情報の宝庫となっていると考えられる。それにも関わらず、PDB などの従来の立体構造データベースでは、酵素蛋白質とリガンドとの関係がアノテーションされていない。

そこで、構造生物学や創薬を支援する観点から、酵素の活性部位とリガンドの反応部位に特に注目し、酵素立体構造のPDB データにおけるリガンドのアノテーションから酵素触媒機構まで包括的に取り入れて、酵素の系統的な分類まで行った、酵素触媒機構データベース・EzCatDBを開発した。このデータベースに関しては、*Nucleic Acids Research* の Database 号に掲載された。

(2)酵素に結合する化合物の解析

従来の酵素関連のデータベースでは、初期化合物である基質及び最終化合物である産物の化学構造などは解析・分類されているが、触媒反応の過程で生成する中間体、あるいは遷移状態の構造に注目されてはいなかった。しかしながら、酵素の触媒機構を考慮する上では、こうした途中過程の化合物の構造も解析しなければいけないと考え、EzCatDB では、そうした化合物やそれらの類似化合物を解析した結果を検索できるようにした。

PDB の酵素データを解析すると、中間体化合物もしくはその類似化合物(アナログ)が結合しているケースが非常に多いことが分かった。また、基質や産物のアナログ化合物だけでなく、こうした中間体・遷移状態などのアナログ化合物から阻害剤などもデザインできると考えた。

(3)酵素触媒機構の階層的分類法の開発

本研究では、酵素の活性部位とリガンドの反応部位を考慮して、加水分解反応、転移反応に関して、次のような階層的分類(RLCP)を行った。

第1階層;基本反応(R)、

第2階層;リガンドの反応部位の構造(L)、

第3階層;触媒機構の種類(C)、

第4階層;酵素側の触媒残基、補酵素の種類など(P)

ここで、第1、第2階層は、基本的に従来の酵素番号と相関のある分類であるが、第3、第4層では、それぞれ、触媒機構、活性部位の構造を考慮している。ここで、第3層の触媒機構は、触媒機構を酵素・リガンド分子の分子内・分子間の小ネットワークとして捉え、触媒基がどのように作用しているかを記述することによって、分類を行っている。

この触媒機構分類 RLCP は、従来の酵素番号による分類と比べて、酵素活性部位の構造と機能との関係を大きく反映するということが分かってきた。

例えば、リガーゼ酵素類の場合、通常、燐酸転移反応の後にアシル基などの転移反応を触媒することが多い。リガーゼ類の活性部位の構造を解析すると、燐酸転移酵素の活性部位とアシル基転移酵素の活性部位の特性を併せ持つことが分かった。従来の酵素番号では、EC 2.-.-.-に分類される転移酵素とは全く別個に、リガーゼは、EC 6.-.-.-に分類される。しかしながら、本研究で構築した階層的触媒反応分類 RLCP を用いると、2種類の転移反応、燐酸転移反応とアシル基転移反応で記述することができる。

つまり、このような触媒機構の階層分類は、蛋白質のドメイン構造の階層的分類(SCOP、CATH)<sup>3,4</sup>と同様に扱うことができる。蛋白質立体構造の場合、各ドメインに対して、それぞれの構造分類を割り当てるのに対して、この触媒機構分類 RLCP では、各素反応に対して、触媒反応分類を割り当てられる。したがって、単一ドメイン、単一反応に対しては、一つで記述することができるが、複数のドメインから成るマルチ・ドメイン蛋白質、複数の反応で構成される触媒反応に対しては、複数の分類で記述することになる。従来の酵素番号が、酵素の名前に対応するのに、触媒機構分類 RLCP は各反応に対応することになる。

加水分解反応、転移反応と同様の手法で、脱離反応、付加反応など他の反応の解析・分類法の開発も進めた。

#### (4)3次元的な酵素触媒機構表示法の開発

PDB の酵素立体構造データは、触媒機構の一部のステップ、スナップショットしか示していない。また、従来の酵素触媒機構は、模式的な図でしか表現されていないことが多い。そこで、創薬を目指す観点からは、立体的な機構を考慮することも重要であると考え、酵素触媒機構の各ステップを三次元的なモデルで表現するシステム、3D-EzCat<sup>1,5</sup>も開発した。

本研究では、PDB に登録されている立体構造データを基に、このような触媒機構をモデリングし、さらに開発した 3D-EzCat で表示することに成功している。このように触媒機構を立体的に表現して解析することは、酵素の立体構造解析結果が増えていくにつれて、重要になってくると考えられる。

#### 5 自己評価:

本研究では、加水分解酵素、転移酵素、異性化酵素やリガーゼ酵素の反応に関して、各基本反応に分割すれば、酵素反応を系統的に記述・分類することを可能にした。

蛋白質のアミノ酸配列、立体構造に関しては、既に様々な比較方法が確立されてきているが、機能に関しては、比較することすら難しかった。本研究では、一見、複雑な酵素の触媒機能を小ネットワークとして捉えることにより、重ね合わせて比較することを可能にした。数多くの酵素蛋白質の触媒機構を解析し、試行錯誤の末に、このような酵素機能の比較方法を世界にさきがけて見出すことができた。また、解析した酵素触媒機構の分類結果をデータベース化し一般公開することも研究期間終了までに遂行することができた。また、このデータベースに関しては、*Nucleic Acids*

ResearchのDatabase号に掲載することもできた。こうした結果は、酵素蛋白質酵素蛋白質の立体構造や触媒機構を考慮して、酵素の触媒機構を分類しデータベース化するという当初の目標を達成したと言えると思う。この研究期間で得られた成果を更に発展させ、従来の酵素番号に替わる配列・立体構造を加味した新しい酵素の分類法へと発展させていくことができると考えている。また、蛋白質の立体構造と機能との関係を研究するのもにも貢献できると考えている。

また、酵素触媒機構表示システム、3D-EzCat を開発し、いくつかの酵素触媒機構を立体的に表現することができたので、立体化学を考慮した触媒機構を可視化するという目標に関しても達成することができたと思う。

#### 6 研究総括の見解:

たんぱく質の機能に関する比較方法に着目し、酵素触媒機構の分類データベースや表示システムという研究ツールを作成し公開したことは評価できる。研究課題に新規機能創製とあるように、今後は新規な機能を有する酵素のモデリング等が出来るよう、本研究を実用に向けて発展させてほしい。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Nozomi Nagano, Christine Orengo & Janet Thornton (2002) One fold with many functions - The evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.* **321**, 741-765.
2. Nozomi Nagano. (2005). EzCatDB: The Enzyme Catalytic-Mechanism Database. *Nucleic Acids Research, Molecular Biology Database on-line compilation 2005*, 613, Online Journal, <http://www3.oup.co.uk/nar/database/summary/613>.
3. Nozomi Nagano. (2005). EzCatDB: The Enzyme Catalytic-Mechanism Database. *Nucleic Acids Research*, **33** Database Issue, D407-D412.

##### 特許

#### 1. 特願 2003-306705

蛋白質機能発現機構表示のための蛋白質構造三次元表示システム

発明者:長野希美 出願人:産総研・科学技術振興機構 出願日:2003年8月29日  
PCT/JP2004/012118(PCT出願日:2004/08/24)

##### 招待講演

1. 長野希美 Glycosidase TIM バレル・スーパーファミリーの立体構造に基づく機能・触媒機構、*GenProC2002 構造ゲノム科学としての情報生物学 - 代表タンパク質の全立体構造が明らかになるときに -*、東京・お台場、平成 14 年 1 月 13 日
2. 長野希美 TIM バレル型糖加水分解酵素スーパーファミリーの構造と機能、*第 218 回 CBI 学会研究講演会「生体高分子情報計算」*、東京・お台場、平成 14 年 5 月 20 日
3. 長野希美 Sequence, structure and function of glycosidase enzymes with TIM barrel folds. *Polish-Japanese Symposium on Bioinformatics*, Poland (Poznan), 平成 14 年 6 月 24 日 - 25 日
4. 長野希美 One fold with many functions- Overview of TIM barrel families (TIM バレル・ファミリーの構造機能分類) *DNA 工学研究会* 東京・お台場、平成 14 年 10 月 9 日
5. Nozomi Nagano. One fold with many functions The analyses of TIM barrel superfamilies based on sequences, structures and functions. *The Second Asian Joint Workshop for Protein Informatics*.大阪、平成 15 年 2 月 28 日

6. 長野希美 配列・立体構造・機能に基づくTIMバレル・フォールドの系統的解析、日本進化学会第5回大会「構造ゲノミクスの時代は分子進化研究にどのようなインパクトを与えるか？」ワークショップ(依頼講演)、九州大学(福岡)、平成15年8月3日
7. 長野希美 酵素触媒機構データベース:EzCatDB - 酵素機能解明から創薬へ 文部科学省科学技術振興費新興分野養成・バイオインフォマティクス第3回「産総研生命科学人材養成コース」シンポジウム、東京・台場・未来科学館 平成16年10月1日
8. 長野希美 酵素の立体構造に基づく触媒反応の解析・分類 第3回生物情報ネットワーク研究会(東京大学医科学主催) 東京・目黒・医科学研究所 平成16年11月25日
9. 長野希美 立体構造、文献情報に基づく酵素触媒反応の解析・分類法 生命知識研究会(SIGBMK) (依頼講演) 東京・台場・産総研 平成16年12月2日
10. 長野希美 酵素触媒反応の階層分類 第27回分子生物学会年会 (招待講演) 神戸・ポートピアホテル 平成16年12月11日

データベース:

1. 酵素触媒機構データベース:EzCatDB 平成16年10月4日公開  
<http://mbs.cbrc.jp/EzCatDB/>