

〈原著〉

検査薬の改良に役立つホモロジーモデリング： その限界の把握

西矢 芳昭

Understanding the limitations of homology modeling: a useful tool for improving diagnostic reagents

Yoshiaki Nishiya

Summary Tertiary structure models of diagnostic enzymes constructed by homology modeling are useful for predicting and improving several enzymatic properties by structural interpretation. Here, the tertiary structures of three diagnostic enzymes that exhibited approximately 30-80% amino acid sequence identities with the known template structures were constructed by homology modeling. These predicted structures were compared with their actual X-ray crystal structures to predict their properties. A clear correlation was found between the properties of the predicted structures and their sequence homologies with the template structures. Moreover, inclusion of gap sequences in the amino acid alignment between the enzymes and their template structures markedly decreased the partial properties of the predicted structures. Understanding the limitations of homology modeling can help engineer diagnostic enzymes with superior quality.

Key words: Enzymatic property, Tertiary structure, Homology modeling, Diagnostic reagent, Protein engineering

1. 緒言

生化学検査薬や酵素免疫測定用試薬などでは、使用酵素の機能改良が精力的に行われ、臨床検査の正確性向上に貢献している¹⁻⁴⁾。酵素の機能改良を合理的に行うには、立体構造の情報が必要である。現在では、ほとんどの検査薬用

酵素のX線結晶構造解析が為され、特定の生物由来酵素の立体構造が明らかになっている。しかしながら、それらの立体構造情報が酵素機能改良に直接役立つケースは少ない。なぜならば、一般に酵素の由来生物（属種）が異なっても基本的な立体構造に変化は少ないものの、酵素特性は変わってしまうからである。臨床検査薬は、

摂南大学理工学部生命科学科
〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17-8
Tel: 072-800-1151
E-mail: nishiya@lif.setsunan.ac.jp

Department of Life Science, Faculty of Science and
Engineering, Setsunan University, 17-8 Ikedanaka-
machi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan
Tel: 072-800-1151
E-mail: nishiya@lif.setsunan.ac.jp

受付日：2018年10月1日
採択日：2018年10月29日

使用酵素の特性の違いが性能の良し悪しに大きく影響する。とはいえ、新たに酵素の結晶構造を解析するには相当な時間と費用がかかり、成功するかも不透明なので、市場規模の大きくない臨床検査薬分野での開発に適用するのは困難である。

そこで、筆者らはホモロジーモデリングを活用した立体構造ベースでの検査薬用酵素の特性予測や改良を積極的に進めてきた^{2,5,12)}。ホモロジーモデリングはバイオインフォマティクス技術のひとつで、アミノ酸配列相同性が高い既知タンパク質の立体構造を鋳型にして、立体構造未知のタンパク質の構造モデルを作成する。ホモロジーモデリングならば、実験無しに短時間で立体構造の予測モデルを得ることができる。例えば、サルコシンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ヘキソキナーゼなどやそれらの変異体の特性予測、乳酸オキシダーゼの変異効果の予測などがホモロジーモデリングによって可能となった^{1-3,12)}。

ホモロジーモデリングを適用するには、鋳型とする結晶構造既知の酵素と対象酵素とのアミノ酸配列相同性が最低30%程度必要といわれている¹³⁾。しかし実際のところ、ホモロジーモデリングの信頼性については不明確で、詳しい調査例が不足している。そこで本報では、ホモロジーモデリングの有用性と限界を把握するため、予測構造とX線結晶構造解析で得られた構造との差異を検討した。具体的には、鋳型構造とのアミノ酸配列相同性が異なる3種の生化学検査薬用酵素 (Table 1) を対象に、ホモロジーモデリングで得た立体構造と実際の立体構造とを比較し、予測構造の特性・精度を評価した。

II. 材料及び方法

1. 検討対象酵素

本研究の対象酵素としては、以下の要素が必要となる。

- (a) ホモロジーモデリングが可能 (鋳型とする結晶構造既知の酵素とのアミノ酸配列相同性が約30%以上) である。
- (b) 検査薬用酵素としての実績があり、過去に予測立体構造モデルに基づく検討データを有する。
- (c) 現在ではX線結晶構造解析が為されており、ホモロジーモデリングで得た予測構造モデルの比較対象となる実際の立体構造が解明され、公表されている。

そこで、これまで筆者らが研究報告を行った酵素の中からTable 1に示す、鋳型構造とする酵素との配列相同性が異なる3種の生化学検査薬用酵素を選定した。サルコシンオキシダーゼ (SoxBN) およびコレステロールオキシダーゼ (ChoxS) に関しては、報告当時 (2003年および1997年) は両酵素の立体構造が解明されていなかったが、ホモロジーモデリングを行い酵素特性や変異効果を構造的に解釈した^{2,8)}。一方、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ (G6pdhL) は2010年に安定性向上変異体を報告した⁴⁾。当時、すでにG6pdhLの立体構造は解明されており、これに基づき変異効果を解釈したが、今回は異なる生物由来酵素の立体構造を鋳型としてホモロジーモデリングを行った。

2. ホモロジーモデリングおよびX線結晶構造との比較

Table 1 Diagnostic enzymes and the template structures used for their homology modeling

Enzyme	Origin	Abbreviation	PDB ID	Structure used for homology modeling		
				Origin	PDB ID	Identity (%)
Sarcosine oxidase	<i>Bacillus</i> sp. NS-129	SoxBN	1ZOVa	<i>Bacillus</i> sp. B-0618	2A89a	79.9
Cholesterol oxidase	<i>Streptomyces</i> sp. SA-COO	ChoxS	4XXG	<i>Brevibacterium sterolicum</i>	3COX	58.4
Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	G6pdhL	1DPGa	<i>Trypanosoma cruzi</i>	6D23a	29.6

アミノ酸配列のホモロジーサーチとアラインメント、およびホモロジーモデリングによる立体構造モデルの構築は、ソフトウェアMOE (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada) を用いて行った¹²⁾。3種の対象酵素 SoxBN、ChoxS、G6pdhLのホモロジーモデリングにおける鑄型構造は、Table 1に示す立体構造データ^{14,15)}をそれぞれ用いた。鑄型構造 (PDB ID: 2A89, 3COX, 6D23) の分解能は、それぞれ1.85、1.8、2.85 Å、対象酵素とのアミノ酸配列相同性はそれぞれ79.9、58.4、29.6%であった。ホモロジーモデリングの中間モデル構造数は100に設定し、最終モデル構造を導いた。

3種の対象酵素のX線結晶構造解析はすでに為されており¹⁶⁻¹⁸⁾、それぞれのPDB IDをTable 1に示す。最終モデル構造 (予測構造) と実際のX線結晶構造との平均二乗偏差 [root mean square deviation for atomic C α positions; RMSD (C α)] は、SoxBNが0.709 Å/381アミノ酸残基、ChoxSが1.29 Å/498アミノ酸残基、G6pdhLが3.13 Å/482アミノ酸残基とそれぞれ見積もられた。

III. 結果及び考察

1. ホモロジーモデリングでの予測構造と実際の立体構造との差異

3種の対象酵素について、最終モデル構造 (予測構造) のラマチャンドラプロットを見たところ、SoxBNはアウトライアーが存在せず、ChoxSとG6pdhLはそれぞれ3および4アミノ酸残基のアウトライアー (ChoxS: Leu-119, Val-122, Ser-391; G6pdhL: Lys-55, Asp-374, Pro-375, Glu-389) が確認された。最終モデル構造 (予測構造) と鑄型構造とのC α 原子位置のRMSD (C α) は、SoxBNが0.567 Å/385アミノ酸残基、ChoxSが0.725 Å/498アミノ酸残基、G6pdhLが1.12 Å/476アミノ酸残基とそれぞれ見積もられた。

次に、それぞれの酵素の予測構造と実際の立体構造 (X線結晶構造) とを重ね合わせた (Fig. 1)。両者をさらに詳細に比較するため、予測構造とX線結晶構造との差異をアミノ酸残基毎のRMSD (C α) の変化として確認した (Fig. 2)。結果として、鑄型構造とのアミノ酸配列相同性が低い酵素ほどRMSD (C α) の大きな箇所が散見され、予測と実際の差異が大きくなる傾向が明確であった。

SoxBNでは、末端を除いてRMSD (C α) が3 Åを超える残基は無かったが、ChoxSでは3つの領域 (残基No.111-123, No.390-392, No.471-474) で合計18残基が3 Åを超えた。さらにG6pdhLでは、末端を除いてRMSD (C α) が6 Åを超える領域が7箇所 (No.50-56, No.63-70, No.99-107,

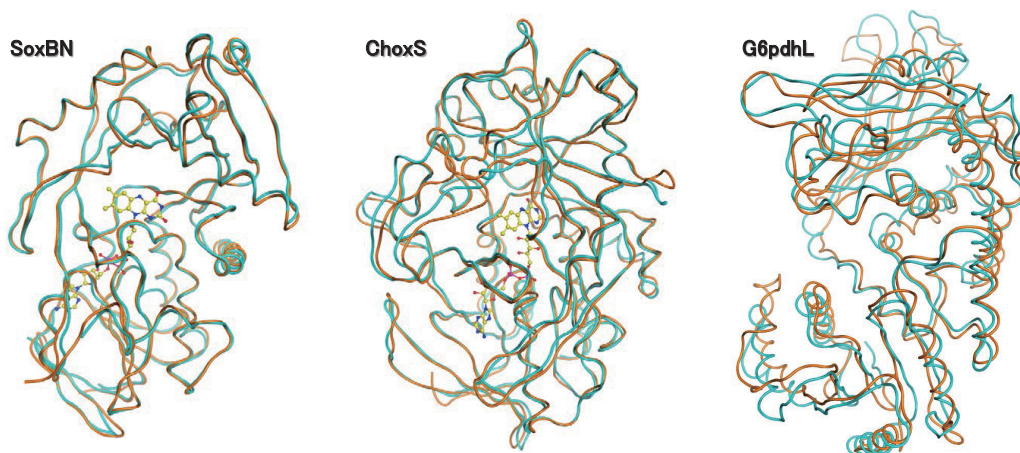


Fig. 1 Superpositions of tertiary structure models. Superpositioning of the structures predicted by homology modeling (orange) and their corresponding X-ray crystal structures (cyan) was performed using the MOE software. The coenzyme, Flavin adenine dinucleotide, is represented as a ball and stick drawing.

No.280-284, No.363-374, No.389-391, No.406-408) で合計40残基、RMSD (C α) が10 Åを超える残基も3箇所存在した。

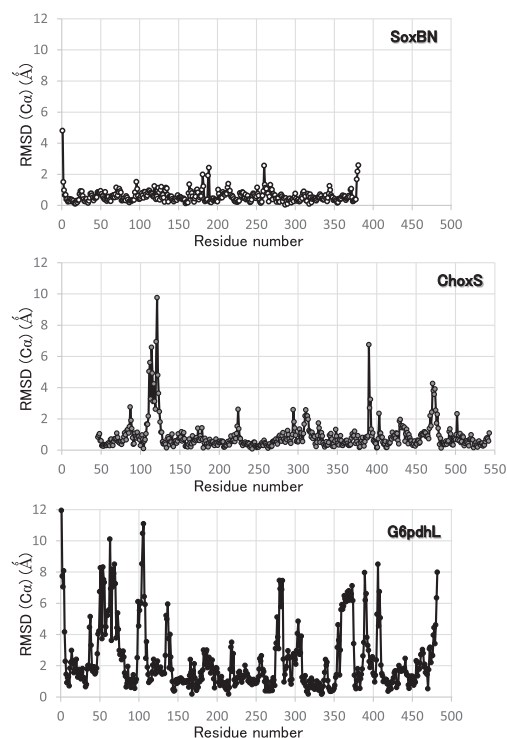


Fig. 2 Distribution of RMSD (C α) between predicted and X-ray crystal structures.

一方、それぞれの酵素のアラインメントを確認したところ、SoxBNと鋳型構造とのアミノ酸配列比較においてギャップ（欠失や挿入）はなかったが、ChoxSでは鋳型構造のアミノ酸配列に対してギャップが1箇所 [残基No.121にて1残基 (Val) の挿入] が見られた。さらにG6pdhLでは、ギャップが合計5箇所 [No.54-55間にて2残基 (Trp-Lys) の欠失, No.98-99間にて3残基 (Ile-Lys-Arg) の欠失, No.137-138間にて1残基 (Glu) の欠失, No.281-284にて4残基 (Asn-Lys-Tyr-Phe) の挿入, No.373-374にて2残基 (Ile-Asp) の挿入] も存在した。これらギャップ領域はすべてRMSD (C α) のピーク付近であり、周辺にもRMSD (C α) の大きな箇所が見られ、全体のRMSD (C α) を押し上げていた (Fig. 2)。

これらのことから、ホモロジーモデリングではアラインメントの際におけるアミノ酸配列のギャップが、予測構造と実際の立体構造との差異をもたらす大きな要因であると確認された。例えば、G6pdhLのNo.54-55間の2残基欠失に対し、ホモロジーモデリングでは単純に2残基の削除で対応していた。しかし実際には、新たなヘリックス構造の形成など大きな変化が起こっており、構造変化はNo.48-81の極めて広い領域に渡っていた (Fig. 3A)。また、No.373-374の2残基挿入は、この領域のループ構造の予想を誤らせたのみならず、前後のループ構造 (No.353-365およびNo.385-396) における予測と実際の

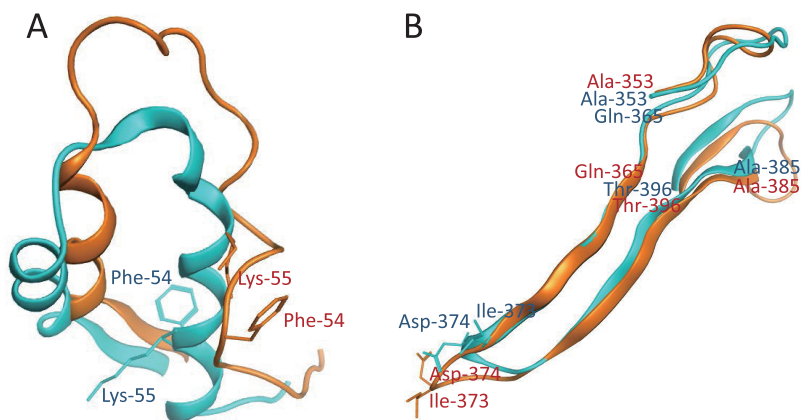


Fig. 3 Close-up views of the gap sequence regions of G6pdhL in its predicted and X-ray crystal structures. Superpositioning of the structures predicted by homology modeling (orange) and their corresponding X-ray crystal structures (cyan) was performed using the MOE software. The landmark amino acid residues are represented as stick drawings.

大きな差異にも影響を与えていた (Fig. 3B)。

2. ホモロジーモデリングの有用性と限界の把握

SoxBNについては、ホモロジーモデリングによる予測構造と実際の立体構造との差異は小さく、過去に実施した予測構造を用いた活性中心の構造的解釈⁵⁾に問題は無いと考えられた。ChoxSについては、筆者らにより安定化と反応pH広範化の両方に効果的なVal-145-Glu変異体が実用化された¹⁹⁾。過去に実施した予測構造を用いた本変異効果の解釈²⁾は、実際の立体構造による解釈と合致した。しかし一方で、過去に得た熱安定性向上変異Val-121-Ala^{2,20)}は予測と実際の差異が大きい領域にあり、予測構造を用いた解釈には限界があることがわかった (Fig. 4)。この変異は、ChoxSにおける唯一の鋳型構造とのギャップ配列と対応していた。

一方、G6pdhLに関しては、筆者らはすでに6種類の熱安定性向上変異 (Phe-65-Leu, Tyr-206-Phe, Asn-239-Ser, Asp-323-Gly, Ser-336-Ala, Lys-352-Arg) を得ている⁴⁾。これらの変異効果の構造的解釈を行ったところ、Phe-65のみ予測構造と実際の立体構造とで状況が大きく異なった (Fig. 5)。結晶構造からの熱安定性向上の解釈

として、Phe-65がNo.46-85のフレキシブルな (B-factorが大きい) 領域の先端に位置しており、その^{かさ}高い側鎖が高温で周囲の残基との立体障害を生じてしまう。Fig. 5に示すように、Cys-61のカルボニル酸素との距離は3.6 Å、Pro-24の側鎖との距離は3.9 Åと特に近いことがわかる。しかしながら、予測構造ではPhe-65とCys-61およびPro-24との距離はそれぞれ7.2および9.8 Åと遠かった。すなわち、予測構造からのPhe-65-Leu変異効果の考察は誤解へと導かれる。

G6pdhLのその他の5変異箇所については、予測構造と実際の立体構造とで状況の差異はほとんど見られなかった (データ示さず)。これらの変異効果を予測構造で解釈することは、問題無いと考える。例えば、Lys-352の近傍にはAsp-205が存在し、Argへの置換で静電的相互作用が強まったと解釈できた。

以上、鋳型構造とのアミノ酸配列相同性の異なる3種の生化学検査薬用酵素を対象に、ホモロジーモデリングで得られた予測構造とX線結晶構造解析で得られた実際の立体構造との差異を検討した。結果として、鋳型構造との配列相同性が低いと予測構造の精度も低下する傾向が

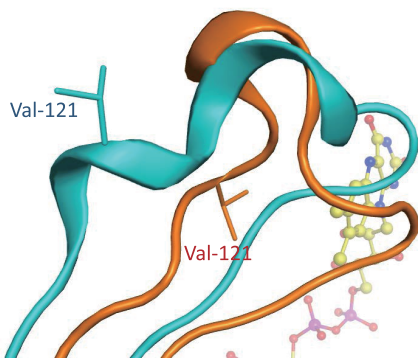


Fig. 4 Close-up view of Val-121 and the surrounding regions of ChoxS in its predicted and X-ray crystal structures. Superposition of the structures predicted by homology modeling (orange) and their corresponding X-ray crystal structures (cyan) was performed using the MOE software. The amino acid residues are represented as stick drawings. The coenzyme, Flavin adenine dinucleotide, is represented as a ball and stick drawing.

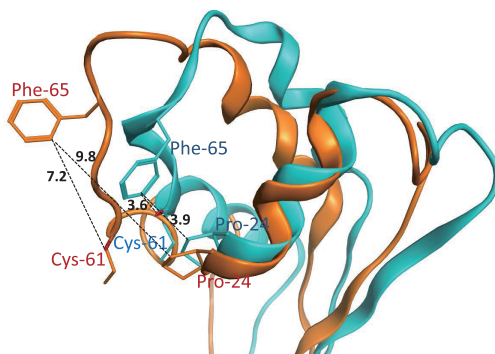


Fig. 5 Close-up view of Phe-65 and the surrounding regions of G6pdhL in its predicted and X-ray crystal structures. The superposition of predicted and X-ray crystal structures, colored in orange and cyan respectively, was performed using the MOE software. The landmark amino acid residues are represented as stick drawings.

認められた。しかし、鑄型構造とのアミノ酸配列比較において、配列相同性以上に留意すべきはギャップの存在である。本研究では、ギャップの近傍のみならず、比較的広い周辺領域にて予測と実際の大きな差異が確認された。ギャップに基づく差異は、鑄型構造との配列相同性が約30%と低いG6pdhLだけでなく、配列相同性が約58%と比較的高いChoxSでも見られた (Fig. 3-5)。一方、配列相同性が約80%のSoxBNではギャップが無いため、予測と実際の差異は小さかった。

本研究でホモロジーモデリングに用いたソフトウェアMOEは、ギャップ部分の予測をSegment Matchingとよばれる方法で対処している。本法は実績を認められているが、それでもギャップ部分や周辺領域は予想外の大きな構造変化を示すので、正解に至るのは難しい。一方、ギャップの無い領域の予測構造がX線結晶構造と少し異なるのは、pH、緩衝液種、沈殿剤など結晶化条件の影響を受けている可能性がある。結晶化条件は通常の酵素反応の条件とは異なる場合がほとんどで、必ずしも予測構造に問題があるとはいえない。例えば、高濃度のイオン性物質が結晶化の際に添加されると、酵素との複合体にて静電的相互作用で立体構造を部分的に変化させることも考えられる。

本検討にて、検査薬用酵素の開発におけるホモロジーモデリングの限界を把握することができた。しかしながら、低コスト、短時間で立体構造に基づく合理的な検査薬用酵素開発、すなわちタンパク質工学を行う手段として、ホモロジーモデリングの有用性は明確である。限界の把握が、ホモロジーモデリングの開発ツールとしての価値をますます高めるだろう。

謝辞

本研究の一部は、JSPS科研費課題番号18K06616の助成を受けたものである。

文献

- 1) Nishiya Y, Zuihara S, and Imanaka T: Active site analysis and stabilization of sarcosine oxidase by the substitution of cysteine residues. *Appl Environ Microbiol*, 61: 367-370, 1995.
- 2) Nishiya Y, Harada N, Teshima S, Yamashita M, Fujii I, Hirayama N, and Murooka Y: Improvement of thermal stability of *Streptomyces* cholesterol oxidase by random mutagenesis and a structural interpretation. *Protein Engineering*, 10: 231-235, 1997.
- 3) Nishiya Y and Kishimoto T: Improvement of thermal stability of *Saccharomyces pastorianus* hexokinase by random mutagenesis and a structural interpretation. *J Anal Bio-Sci*, 32: 307-312, 2009.
- 4) Kusumoto M, Kishimoto T, and Nishiya Y: Improvement of thermal stability of *Leuconostoc pseudomesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Anal Bio-Sci*, 33: 397-400, 2010.
- 5) Nishiya Y and Shimozawa Y: Properties of *Geobacillus stearothermophilus* malate dehydrogenase used as a diagnostic reagent and its characterization by molecular modeling. *Int J Anal Bio-Sci*, 4: 21-27, 2016.
- 6) Nishiya Y: Structural comparison of creatinases for investigating substrate binding. *Int J Anal Bio-Sci*, 2: 143-147, 2014.
- 7) Nishiya Y and Hirayama N: Molecular modeling of the *Arthrobacter* sarcosine oxidase. *J Anal Bio-Sci*, 25: 343-346, 2002.
- 8) 西矢芳昭, 平山令明: 診断用酵素サルコシンオキシダーゼにおける構造と機能の関連性. *生物試料分析*, 26: 191-195, 2003.
- 9) Nishiya Y and Kishimoto T: Alteration of L-proline oxidase activity of sarcosine oxidase and a structural interpretation. *J Anal Bio-Sci*, 33: 161-166, 2010.
- 10) Hiruta M and Nishiya Y: Structural prediction and interpretation of the substrate specificity of a lactate oxidase from *Enterococcus* sp. NBRC3427. *Int J Anal Bio-Sci*, 5: 30-36, 2017.
- 11) Hiruta M and Nishiya Y: Creation of an L-mandelate oxidase via structure-guided design of engineered lactate oxidase. *Int J Anal Bio-Sci*, 6: 25-29, 2018.
- 12) 西矢芳昭: 酵素立体構造および反応予測に基づく尿素窒素のダブルカイネティックアッセイの考察. *生物試料分析*, 41: 162-167, 2018.
- 13) 由良敬: タンパク質の立体構造に基づく相互作用構造の推定. *薬学雑誌*, 128: 1547-1555, 2008.
- 14) Chen Z-W, Zhao G, Martinovic S, and Jorns MS, Mathews FS: Structure of the sodium borohydride-reduced N-(cyclopropyl)glycine adduct of the flavoenzyme monomeric sarcosine oxidase. *Biochemistry*, 44: 15444-15450, 2005.
- 15) Li J, Vrielink A, Brick P, and Blow DM: Crystal structure of cholesterol oxidase complexed with a steroid substrate: implications for flavin adenine dinucleotide dependent alcohol oxidases. *Biochemistry*,

- 32: 11507-11515, 1993.
- 16) Nagata K, Sasaki H, Hua M, Okai M, Kubota K, Kamo M, Ito K, Ichikawa T, Koyama Y, and Tanokura M: Crystal structure of monomeric sarcosine oxidase from *Bacillus* sp. NS-129 reveals multiple conformations at the active-site loop. *Proc Jpn Acad*, 81: 220-224, 2005.
 - 17) Golden E, Attwood PV, Duff AP, Meilleur F, and Vriehink A: Production and characterization of recombinant perdeuterated cholesterol oxidase. *Anal Biochem*, 485: 102-108, 2015.
 - 18) Rowland P, Basak AK, Gover S, Levy HR, Adams MJ: The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure*, 2: 1073-1087, 1994.
 - 19) 西矢芳昭, 川上文清: コレステロール測定試薬とコレステロールオキシダーゼ. 酵素利用技術体系, エヌ・ティー・エス, 593-596, 2010.
 - 20) Nishiya Y, Yamashita M, Murooka Y, Fujii I, and Hiramaya N: Effect of non-ionic detergents on apparent enzyme mechanism: V121A mutant of *Streptomyces* cholesterol oxidase endowed with enhanced sensitivity against detergents. *Protein Engineering*, 11: 609-611, 1998.