理論/実験 技術

プロファイル比較法FORTEを利用したタンパク質立体構造予測

産業技術総合研究所生命情報科学研究センター

富井健太郎

1. はじめに

構造既知タンパク質と配列類似性が検出されなかったタンパク質でも、その構造を解いてみると既知構造と何らかの類似性を有する割合が多いことが知られている¹⁾。こうした状況を踏まえると、既知構造を利用したタンパク質立体構造予測の適用可能範囲は、非常に大きいことが期待される。プロファイル比較法は、この適用範囲を効果的に拡大するものとして近年期待を集めており、手法の改良もさかに行われている。本稿では、予測対象タンパク質と既知立体構造との類似性を検出するために開発されたプロファイル比較法FORTEについて紹介する。また、2004年に開催された立体構造予測実験CASP6²⁾の結果—特にPSI-BLAST³⁾を用いても類似性を検出できなかったタンパク質のカテゴリであるフォールド認識とよばれる部門での結果—を例として、FORTEを利用したタンパク質立体構造予測の実際について紹介する。

2. アミノ酸配列の情報解析とタンパク質立体構造予測

2.1 既知立体構造を用いた予測における問題点

タンパク質の既知立体構造を鋳型として利用する構造予測(比較モデリング⁴⁾)では、予測対象配列とその鋳型となる構造既知タンパク質のアミノ酸配列との正確なアラインメントが与えられていることが大変重要である。局所配列比較法と問い合わせ配列のプロファイルとを逐次的に組みあわせたPSI-BLASTの類似配列検出感度は、ベアワイズアラインメントを利用した検索法に比べると非常に強力なものであるが、それでも遠縁関係を見逃す割合が多い¹⁾。また、比較する配列相

互の同一残基率が低い場合、アラインメント精度の劣化が報告されている^{5),6)}。それゆえ、既知立体構造を利用した構造予測の有効性を一層高めるためには、類似構造検出能力と同時に、アラインメント精度もより優れた手法の開発が期待されるのである。

2.2 プロファイル比較法の登場

プロファイルとは、問い合わせ配列とその相同配列とのマルチプルアラインメントから導出される位置特異的なスコア行列である⁷⁾。プロファイル対プロファイルアラインメント(以下、プロファイル比較)法は、問い合わせ配列のプロファイルのみを用いて検索を行うPSI-BLASTよりも、検出感度とアラインメント精度の両方の観点からみて、さらに優れた手法であると考えられている。この理由として、1) 問い合わせ配列と既知配列の中間にある配列情報が、比較されるプロファイルの双方に含まれるために生じる効果。これは中間配列検索法(ISS法)⁸⁾のある程度の有効性を考えても納得しやすい。2) 類縁関係タンパク質から抽出された進化的な情報(特徴的な配列パターン)相互を比較することで、より遠縁関係の検出が可能になる、という点が考えられる。

プロファイル比較では、比較されるプロファイルの各サイトにおける出現頻度に応じたアミノ酸種毎のスコア(20次元のベクトル)相互の類似度が計算され、これがベアワイズアラインメントにおけるアミノ酸相互の類似度スコアに相当する役割を担う。類似度の計算には、内積や、相関係数、あるいは拡張された対数オッズスコアなどさまざまな方法の適用が提案されている⁹⁾⁻¹¹⁾。プロファイル比較を最初に立体構造予測に応用したRychlewskiら⁹⁾をはじめ多くのグループが、プロファイル比較法は遠縁タンパク質同定に有効であるという伝統的立場にたっており、類縁関係タンパク質内での保存的な配列パターンの特徴を比較するという観点から、内積や、拡張された対数オッズスコアなどを採用している。これに対して筆者は、アミノ酸置換パターンは類縁関係に特異的なものだけではなく、各サイトの置かれた立体構造上の「環境」¹²⁾にもおおいに依存すると考え、保存的な部位以外の比較も構造類似性の認識には重要であるという立場から、相関係数を採用している。また、実利的な面で、例えば内積と比較した場合、類縁関係の認識感度の上昇(Fig. 1)や、他のさまざまな類似度の計算方法と比較しても立体構造類似性の検出能力が高く、同一残基率が低い場合で

Protein Structure Prediction Using a Profile-Profile Comparison Method: FORTE

Kentaro TOMII

Computational Biology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Fig. 1 Results for remote homology detection using correlation coefficients (thin line) and inner products (dotted line) are plotted in terms of specificity (TP/(TP+FP)) vs. sensitivity (TP/(TP+FN)). TP: true positive, FP: false positive, FN: false negative. Search results are shown (a) at the SCOP family level and (b) at the SCOP superfamily level. The dataset that was used for the benchmarks contains 948 protein single domains derived from the SCOP database using a 30% sequence identity cutoff and a resolution of 2.5 Å or better.

もアラインメント精度が比較的良好¹⁰⁾であるというメリットがあるものと考えている。ただし、アラインメ

ント精度に有意な差はないとする報告もある¹³⁾。

3. FORTEを用いたタンパク質立体構造予測

3.1 FORTEの概要

FORTEは、タンパク質立体構造類似性検索のために開発されたプロファイル比較法であり、Fold Recognition Techniqueを略して命名された。FORTEでは、予測対象タンパク質のプロファイルを問い合わせとする構造類似性検索が、次に示す手順で実行される。

(0) 比較するプロファイルの作成

構造既知ライブラリのタンパク質プロファイルおよび予測対象タンパク質のプロファイルは、おもに PSI-BLAST と NCBI の NR データベースを利用して作成される。この工程の詳細は、後述のように手法により異なる。既知構造ライブラリのタンパク質セットは、立体構造分類データベース SCOP¹⁴⁾ から相互の配列同一残基率が40%を超えないよう選択された代表ドメインおもに依存している。

(1) プロファイル相互の最適アラインメントとそのスコアの計算

プロファイル相互のアラインメント作成には、動的計画法が用いられる。経験的にある程度最適化されたアフィンギャップペナルティを使用し、N-とC-両末端のギャップにはペナルティを課さない。プロファイルサイト間の類似性尺度には、相関係数を採用した。

(2) アラインメントスコアの統計的有意性の推定

(1)の方法によりライブラリ全体に対する検索が行われた後、個々のアラインメントスコアに対するZ-scoreが計算され、統計的有意性が評価される。Z-scoreの計算には、残基長の対数に応じたスコア補正が用いられる。

CASP6への参加にあたり、既知構造情報の立体構造予測へのさらなる利用を目的として、最初に開発したFORTE1とは異なる複数のプロファイル構築法を利用した手法を開発した。各々のプロファイル構築に用いた

Table 1 Profile construction methods of the FORTE series

Versions of FORTE	Query proteins	Library proteins with known structures
FORTE1	PSI-BLAST	PSI-BLAST
FORTE2	PSI-BLAST	FORTE1+PSI-BLAST
FORTE1T	T-Coffee+PSI-BLAST	T-Coffee+PSI-BLAST
FORTE-H	PSI-BLAST (for sequence profile)	PSI-BLAST (for sequence profile)
	PSIPRED (for structural profile)	FORTE1 (for structural profile)
FORTE-SS	PSI-BLAST+sliding window	PSI-BLAST

Names of profile-profile comparison methods are designated in the first column. The profile construction methods for query proteins are shown in the second column and for library proteins in the last column.

Fig. 2 Flowchart of our prediction protocols in CASP6.

手法は、Table 1にまとめた通りである。FORTE1¹⁵⁾では、予測対象と、構造既知タンパク質の双方について、PSI-BLASTにより作成される配列プロファイルが使用される。FORTE2では、FORTE1により検出された構造類似タンパク質の情報をライブラリのプロファイル構築時に取りこむことで、さらなる検出能力の向上を図った。FORTEITでは、アラインメント精度のさらなる向上を目指し、プロファイル構築のためのシードとなるマルチプルアラインメントの作成にT-Coffee¹⁶⁾を用いた。FORTE-Hでは、配列情報だけでなく、構造情報も取り込み、検出感度とアラインメント精度の向上を目指した。FORTE-SSでは、予測対象プロファイルをさまざまな長さのスライディングウィンドウを用いて分割し、上記4手法では見いだすことが困難な局所的類似性の発見を目的とした。

CASP6でのFORTEを用いた構造予測のおもな手順¹⁷⁾は、Fig. 2および以下に示す通りである。

(1) FORTEの4手法を用い、予測配列と構造既知タンパク質とのアラインメントを計算する。通常Z-scoreが8以上のものが得られれば、それらすべてを次の構造モデル構築の過程で用いた。経験的に得られたこの閾値以上であると、正確なアラインメントが得られている確率が高い。Z-scoreが8に満たない場合、得られた上位各100のアラインメントを次の過程で用いた。この場合、FORTE-SSによる計算も行った。

(2) (1)で得られたアラインメントにもとづき、構造モデルの構築を行う。1つのアラインメントあたり10(場合により100)個のモデルを構築する。

(3) 構築した全モデルについて、統計的ポテンシャル

ル^{12), 18)}を用いて検証とその順位づけを行い、最終的に提出する予測構造の選択を行った。

3.2 CASP6への参加とその結果

タンパク質立体構造予測法の発展と、客観的評価の場の提供を目的として、1994年より2年に一度、CASP (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction) とよばれる大規模な立体構造予測実験が開催されている。CASPは、立体構造解析がある程度進行しているが、当該時点で構造未知のタンパク質から予測対象が選ばれ(というよりむしろ、実験者の好意により問題として提供され)、構造解析実験の終了までに予測結果を提出するという形式で行われている。第6回目の構造予測実験CASP6は2004年に開催された¹⁹⁾。

CASPでは各問題につき、提出者自身が優先順位をつけた上で最大5個までの予測モデルの投稿が可能であるが、FR/H (Fold Recognition/Homology) 部門では基本的に第1モデルのみが評価の対象となった。相異なる特徴をもつ6つの立体構造比較法を用いて、問題毎に、各グループが提出した予測構造モデルと実際に解かれた立体構造との類似度が計算された。この類似度にもとづく相対的評価値の、全23問での総和と平均が最終評価に用いられた。実際に解かれた構造とわれわれの予測した構造との比較結果は、Table 2にまとめた通りである。現状では、FR/H部門の約3/4のタンパク質について、少なくとも4割を超える残基について、C_αRMSDが2~3 Å程度の精度のモデル構築が可能であることがわかる(表中の網掛け部分)。他グループとの相対的な比較では、第3位という評価を受けた。またフォールド認識部門全体でも、第4位という結果であった²⁰⁾。

Table 2 Summary of Predictions for FR/H Targets

Target	Length	%	RMSD
T0197(1xkc)	30/166	18	2.98/13.61
T0199_2(1stz)	60/134	45	3.34/15.37
T0202_1(1suw)	66/123	54	2.56/5.85
T0203(1vkp)	172/365	47	2.65/10.93
T0206(2cuo)	24/138	17	2.96/15.49
T0213(1te7)	65/103	63	2.25/5.87
T0214(1s04)	65/110	59	2.70/4.85
T0222_2(1vli)	61/64	95	1.49/1.67
T0223_2(1vkw)	79/92	86	2.26/3.30
T0224(1rhx)	71/87	82	2.39/4.04
T0227(1wk2)	50/84	60	2.32/13.46
T0228_1(1vlp)	68/157	43	2.45/11.73
T0228_2(1vlp)	102/235	43	2.66/33.72
T0237_1(1w8k)	13/153	8	2.93/16.03
T0237_2(1w8k)	11/99	11	2.32/11.58
T0237_3(1w8k)	7/54	13	2.53/5.73
T0239(1rki)	25/98	26	2.54/15.78
T0243	64/88	73	2.61/5.16
T0249_1(1t6s)	42/73	58	2.82/6.89
T0249_2(1t6s)	62/77	81	2.13/4.18
T0251(1xg8)	52/99	53	2.90/5.69
T0262_2(1wfx)	49/97	51	1.77/9.18
T0263(1wd6)	84/97	87	1.98/4.54

The first column shows CASP identifiers of FR/H targets. The PDB identifiers of the targets are indicated in parentheses. The T0243 structure has not been made publicly available, yet. The second column shows the number of structurally equivalent residues between our first models and the native structure of targets, and the number of residues of the targets. Structurally equivalent residues are determined after superposition with a 5 Å equivalence cutoff. The third column presents numbers correspond to a fraction of structurally equivalent residues. The last column lists values of C_{α} RMSD of structurally equivalent residues between our model and the native structure, and C_{α} RMSD of whole residues. Rows of targets for which we can provide “accurate” (see text) models are shaded.

もちろんこの結果は合理的だが、問題に応じた不定形な人的判断の介入に依る部分もある。しかし、結果の多くの部分において、自動化された手法の重要性が確認されている^{17,20)}。

3.3 結果の検討と今後の課題

われわれの予測手法は、プロファイル比較にもとづくアラインメント作成と、それらにもとづく構造モデルの網羅的構築、そして一般に普及している統計ポテンシャルを用いた構造評価関数によるモデルのスクリーニングという非常に単純な手順ではあるが、既知構造

Fig. 3 Our first model (ribbon) and native structure (thick line) for the FR/A target, T0212(1tza). (カラー図は電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> 参照)

を利用した予測法として非常に有効なものであることが裏づけられたといえよう。この原因の1つとして、プロファイルサイト相互の類似度の計算に、相関係数を用いたことがあげられるかもしれない。すでに述べたように、相関係数を用いることで、他の類似度計算法と比較して、類似性検出能力とアラインメント精度の向上を期待した。しかし実際には、プロファイル比較による予測精度は、類似度の計算法以外のさまざまな要因（マルチプルアラインメントの作成法、プロファイルスコアの計算法、既知構造ライブラリとして使用するタンパク質のセット、など）により影響を受け得る。よって、筆者の作業仮説の妥当性と予測精度のさらに厳密な検証は、追求されるべき重要な課題である。

次に、統計ポテンシャルを用いた構造評価関数による候補モデルの選択がうまく機能したことがあげられる。その典型例が、FR/A (Fold Recognition/Analogy) 部門の問題の1つである T0212 に対する予測結果である²¹⁾。この問題では、統計的に有意な (Z-score が8以上の) アラインメントは得られず、5種類のFORTE法で得られた上位各々100 (合計500) アラインメントにもとづきモデル構築を行い、その中から統計的ポテンシャルを用いて候補構造の選択を行うことで正確なモデル (全長の60%以上に相当する76残基について C_{α} RMSDが3.0 Å; Fig. 3) を予測することができた。この結果は、主要なコンセンサス予測サーバが提示していた、予測信頼度の低い、本来の構造とは異なるトポロ

ジーを有するタンパク質にもとづくモデルを、ほとんどのグループが提出していたのと対照をなすものであった。このように、統計ポテンシャルを用いた候補構造モデルの選択は概してうまく機能したものの、細部を観察するとかならずしも最良モデルを選択できていたわけではないことから、改善の余地があると考えている。

構築した5種類のプロファイル比較法の予測結果には、予測問題全体の統計をとると劇的な差はない。しかしT0212の例にみられるように、異なるプロファイル比較法を利用することで、予測対象タンパク質と既知構造との類似性について検出可能な範囲を拡大、あるいはより精度のよいアラインメントを提供することができたものと考えられる。このような好結果が得られる一方で、フォールド認識部門でわれわれより上位に位置したグループが、予測対象と相同なタンパク質についての予測結果のコンセンサス情報を最終的な予測に使用していたことを考えると、この方向での発展も今後取りくむべき課題であろう。

4. おわりに

今回紹介したような鋳型構造を利用したタンパク質立体構造予測法によって未知タンパク質の立体構造モデルが提供されることで、構造類似性の観点からの類縁関係の推定や、活性部位の推定・比較などがある程度可能になるものと考えられる²²⁾。また今後、より精密な構造モデルの提供が可能になれば、分子動力学計算やドッキング計算の初期構造、あるいはX線結晶構造解析の分子置換法の参照分子モデルとして使用されることにもなるかもしれない。

現在、<http://www.cbrc.jp/forte/> においてFORTE1サービスの公開(学術研究利用に限る。それ以外の場合は、別途ライセンス契約が必要)を行っている¹⁵⁾。予測対象タンパク質のアミノ酸配列をFASTAフォーマットで入力すると、統計的有意水準の厳しいものから順に、問いあわせ配列とライブラリに含まれる構造既知タンパク質とのアラインメント上位20がユーザーに返答される。

謝 辞

CASP6における立体構造予測は、当研究センターの広川貴次チームリーダー、本野千恵研究員との共同研

究によるものです。深甚なる謝意を表します。また執筆の機会を頂き、感謝致します。

文 献

- 1) Brenner, S. E. and Levitt, M. (2000) *Protein Science* **9**, 197-200.
- 2) <http://predictioncenter.org/>
- 3) Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- 4) Fiser, A. and Sali, A. (2003) *Methods Enzymol.* **374**, 461-491.
- 5) Sauder, J. M., Arthur, J. W. and Dunbrack, R. L., Jr. (2000) *Proteins* **40**, 6-22.
- 6) Elofsson, A. (2002) *Proteins* **46**, 330-339.
- 7) Eidhammer, I., Jonassen, I. and Taylor, W. R. (2004) *Protein Bioinformatics: An Algorithmic Approach to Sequence and Structure Analysis*, pp. 123-140, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex.
- 8) Park, J., Teichmann, S. A., Hubbard, T. and Chothia, C. (1997) *J. Mol. Biol.* **273**, 349-354.
- 9) Rychlewski, L., Jaroszewski, L., Li, W. and Godzik, A. (2000) *Protein Science* **9**, 232-241.
- 10) Wang, G. and Dunbrack, R. L., Jr. (2004) *Protein Science* **13**, 1612-1626.
- 11) Ohlson, T., Wallner, B. and Elofsson, A. (2004) *Proteins* **57**, 188-197.
- 12) Lüthy, R., Bowie, J. U. and Eisenberg, D. (1992) *Nature* **356**, 83-85.
- 13) Edgar, R. C. and Sjolander, K. (2004) *Bioinformatics* **20**, 1301-1308.
- 14) <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>
- 15) Tomii, K. and Akiyama Y. (2004) *Bioinformatics* **20**, 594-595.
- 16) Notredame, C., Higgins, D. and Heringa, J. (2000) *J. Mol. Biol.* **302**, 205-217.
- 17) Tomii, K., Hirokawa, T. and Motono, C. (2005) *Proteins* **61**, 114-121.
- 18) Sippl, M. J. (1993) *Proteins* **17**, 355-362.
- 19) 千見寺浄慈, 高田彰二, 本野千恵, 富井健太郎 (2005) *生物物理* **45**, 165-167.
- 20) Wang, G., Jin, Y. and Dunbrack, R. L., Jr. (2005) *Proteins* **61**, 46-66.
- 21) Vincent, J. J., Tai, C., Sathyanarayana, B. K. and Lee, B. (2005) *Proteins* **61**, 67-83.
- 22) Watson, J. D., Laskowski, R. A. and Thornton, J. M. (2005) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 275-284.

プロフィール比較法FORTEを利用したタンパク質立体構造予測

富井健太郎（とみい けんたろう）

産業技術総合研究所生命情報科学研究センター研究員

連絡先：〒135-0064 東京都江東区青海2-42

E-mail: k-tomii@aist.go.jp