特集論文

タンパク質構造データマイニングのための三次元モチーフ辞書の作成

Construction of a Three-Dimensional Motif Dictionary for Protein Structural Data Mining

加藤 博明
Hiroaki Kato

豊橋技術科学大学 知識情報工学系
Dept. Knowledge-based Information Engineering, Toyohashi University of Technology.
hiro@cilab.tutkie.tut.ac.jp

田所 哲男
Tetsuo Tadokoro

(同上)

宮田 博之
Hiroyuki Miyata

(同上)

近松 信一
Shin-ichi Chikamatsu

(同上)

高橋 由雅
Yoshimasa Takahashi

(同上)

taka@mis.tutkie.tut.ac.jp

阿部 英次
Hidetsugu Abe

(同上)

abe@cilab.tutkie.tut.ac.jp

Keywords: protein motif, structural similarity, data mining, motif dictionary, PROSITE

Summary

With the rapidly increasing number of proteins of which three-dimensional (3D) structures are known, the protein structure database is one of the key elements in many attempts being made to derive the knowledge of structure-function relationships of proteins. In this work, the authors have developed a software tool to assist in constructing the 3D protein motif dictionary that is closely related to the PROSITE sequence motif database. In the PROSITE, a structural feature called motif is described by a sequence pattern of amino acid residues with the regular expression defined in the database. The present system allows us to automatically find the related sites for all the 3D protein structures taken from a protein structure database such as the Protein Data Bank (PDB), and to make a dictionary of the 3D motifs related to the PROSITE sequence motif patterns. A computational trial was carried out for a subset of the PDB's structure data file. The structural feature analysis resulted with the tool showed that there are many different 3D motif patterns but having a particular PROSITE sequence pattern. For this reason, the authors also tried to classify the 3D motif patterns into several groups on the basis of distance similarity matrix, and to determine a representative pattern for each group in preparing the dictionary. The usefulness of the additional approach for preparing the 3D motif dictionary is also discussed with an illustrative example.

1. はじめに

タンパク質は主たる遺伝情報の最終的な発現系となる生体高分子であり、その三次元構造と機能との間には密接な関係があることはよく知られている事実である。特にモチーフと呼ばれるタンパク質構造中に特定の配置

で存在する局所構造特徴は、遺伝子配列の中でもよく保存されている部分であると考えられる[Branden 91, 中村 95]。従って、タンパク質のモチーフ構造探索、あるいは広い意味での共通構造特徴の探索はタンパク質の構造-機能解析だけでなく、遺伝情報解析においても極めて重要な問題の一つである。一方、ヒトゲノム計画の進展、並びにタンパク質構造決定技術の進歩に伴い立体構造の

表1 PROSITE 中の配列モチーフの例

モチーフ	種類	パターン
Kringle	ドメイン	[FY]-C-R-N-P-[DNR].
Zinc finger C2H2	DNA 結合	C-x(2,4)-C-x(3)-[LIVMFYWC]-x(8)-H-x(3,5)-H.
Protein splicing	翻訳後修飾	[DNEG]-x-[LIVFA]-[LIVMY]-[LVAST]-H-N-[STC].
EF-hand	カルシウム結合	D-x-[DNS]-{ILVFYW}-[DENSTG]-[DNQGHK]-{GP}- [LIVMC]-[DENQSTAGC]-x(2)-[DE]-[LIVMFYW].

* パターン中で, x はその位置で任意のアミノ酸と, [] はその中のどれかのアミノ酸と, { } はその中以外のいずれかのアミノ酸と対応することをそれぞれ意味する. また, 要素の後の () 内の数字はその要素の繰り返しを表現し, 例えば, x(n) は連続する n 個の, x(n,m) は n 個から m 個まで (n < m) の任意のアミノ酸とマッチすることをそれぞれ示す.

データは急速に増加しており, その構造データベースはタンパク質の構造と機能との関係解明など分子生物学上の新たな知識獲得のための基本要素としてその重要性はますます高まっている[Thornton 89, 金久 97]. しかし, タンパク質構造の巨大さや複雑さ, さらに近年の急激なデータ数の増大から, 手動によるモチーフの検索やその特徴解析はほとんど不可能となっている. そのため, これらのデータベースを有効に活用し, 三次元構造特徴の系統的な解析(タンパク質構造データマイニング)を行なうための方法論の確立, 並びに有効なコンピュータツールの開発が切望されている.

このため筆者らはこれまでに, グラフ論的な部分構造検索技法[Kuhl 84, Bron 73]を基礎とした三次元モチーフ構造検索アルゴリズム, さらに質問構造の設定を要求しない複数タンパク質間の三次元共通構造特徴(新規モチーフ候補部位)の自動認識に向けての基本アルゴリズム, 並びに対応するシステムの開発を進めてきた[Kato 97, Kato 01]. 一方, アミノ酸配列(一次構造)レベルでの特徴解析は比較的早くからなされており, 配列アライメント手法によるホモロジ-(相同性)解析など様々な

方法が提案されている[Gribskov 91]. このうち Bairoch は配列レベルのモチーフ情報を文献等から広く収集して電子化したモチーフ辞書 PROSITE を作成, 公開している[Bairoch 91]. PROSITE には酵素の活性部位やリガンド結合部位の他, タンパク質の細胞内の局在部位を決めるシグナル配列などが収められている(表1).

本研究では三次元分子構造特徴解析に基づく知識発見の視点から, この既存の知識ベースともいえる PROSITE に登録されている配列モチーフパターンに注目し, これに対応する三次元部分構造情報を網羅的に集積するためのプログラムの開発を試みた. また, 集積した対応三次元部分構造群を定量的に比較・分類し, 各配列モチーフに対応する代表三次元幾何パターンを決定するための方法についても併せて検討した.

2. 方法

2.1. 配列モチーフ検索

PROSITE では, 配列モチーフを一種の正規表現を用いてパターンとして定義している. 本研究では Protein Data Bank (PDB [Bernstein 77]) に登録された三次元構造既知のタンパク質構造情報を対象に, PROSITE で定義された配列モチーフ部位を検索し, その対応する三次元部分構造をデータベースファイル(三次元モチーフ辞書)へ集積する. ここでは, タンパク質の三次元構造情報はその構成アミノ酸残基を単位として取り扱い, 各アミノ酸のアルファ炭素(C α)原子の座標で代表して縮約表現することとした. また処理の効率化のために, あらかじめ PDB ファイルから鎖単位でアミノ酸配列情報のみを抽出したファイルと, その三次元構造情報(結合表形式)を抽出したファイルの二つを作成し利用した.

本研究では, ユーザの目的によって対話的あるいはバッチ的な使い分けできるように, 次の四つの実行モードを定義し, Microsoft Windows 上で Visual C++ 6.0 及び

図1 配列モチーフ検索プログラムの実行画面例

VisualBasic 6.0 を用いて検索プログラムの実装を行なった．プログラムの実行画面例を図 1 に示す．

ある一つのタンパク質の配列データを対象に，ある一つの配列モチーフを指定し検索するモード (Single-Single)

データベースに保存された複数のタンパク質の配列データを対象に，ある一つの配列モチーフを検索するモード (Multi-Single)

一つの配列データを対象に，複数の配列モチーフを検索するモード (Single-Multi)

複数の配列データを対象に，複数の配列モチーフを検索するモード (Multi-Multi)

バッチモードでの検索でヒットしたタンパク質及び対応部位情報は一時ファイル (MS-Access 形式のデータベースファイル) に登録され，必要に応じてここから対応部位の一覧情報を記述したファイル (インデックスファイル (表 2)) や，各対応部分構造の結合表ファイルを取得することができる．ここで，インデックスファイルの一行目にはヘッダ情報としてモチーフの PROSITE 中での ID 番号，対応部位の数，構成残基数 (サイズ) が異なる部位の数，及びその残基数を記述した．例えば，表 2 のケースでは，表 1 に示した Zinc finger C2H2 モチーフ (ID: PS00028) に対応する部位が対象データベース中で延べ 5 個検索されている．また，このモチーフはその柔軟なパターン定義により，残基数 21~25 の複数の可能なパターンに展開できるが，ここでは，このうち 21, 22, 23 の 3 種類のパターンがヒットしたことを示している．また，二行目以降は各対応部位について，シーケンシャル番号，PDB コード (必要に応じて鎖名を付加)，サイズ，開始及び終了位置番号の情報を記した．例えば，表 2 の第 1 番目の対応部位は PDB コード 1A1I の A 鎖中に存在する 21 残基で構成され，その配列上の位置は 137 番目の Cys から 157 番目の His までであることを示している．また，これらの得られた三次元部分構造をグラフィックス表示するためのインターフェースプログラムも併せて実装し，結果を視覚的に検証できるよう工夫した．表示には対応する PDB ファイルを参照し，表示ツールとして MDL 社の Chemscape Chime プラグインを，対応部位の指定には RasMol スクリプト形式 [Sayle 95] を用いた．作成したプログラムでは，前述のインデックスファイルを入力し，表示モデル等の指定を行ない，HTML ファイルの出力を行なう．表示画面例を図 2 に，ユーザが指定可能なメニューの一覧を以下に示す．

表示する三次元部分構造の指定

表示モードの指定

(全構造，部分構造，両方)

表示モデルの指定

(Ball&Stick, Spacefill, Ribbons 等)

画面のサイズと分割数

表 2 インデックスファイルの例

PS00028	5	3	21	22	23
1 1A1IA	21	---	C	137	- H 157
2 1A1IA	21	---	C	165	- H 185
3 1A1IA	23	---	C	107	- H 129
4 2DRPA	22	---	C	113	- H 134
5 2DRPA	22	---	C	143	- H 164

図 2 対応三次元部分構造のグラフィックス表示例

2.2. 三次元部分構造の比較

以上で集積された共通の配列パターンを持つ三次元部分構造を検証した結果，その構造が大きく異なるものがいくつか存在した．そこで，次にこれらの三次元部分構造を定量的に比較・分類する方法について検討した．前述のとおり，本研究では三次元部分構造をアミノ酸残基単位で取り扱い，それぞれ C α 原子の座標で代表して表現する．このようにして表現した二つの部分構造内の対応する 2 点 (C α 原子) 間のユークリッド距離の平均誤差 (ここでは 100 倍して整数化した) を求め，これをこれら二つの構造間の類似度 (相違度) の尺度と定義した，(式 1)．なお，PROSITE のパターン定義により，サイズ (構成アミノ酸残基数) が異なる部分構造が発生した場合は，より小さい方の部分構造を基準とし，配列順序を維持したまま可能な組み合わせを全て列挙する．そして，それぞれ上記の相違度の値を計算し，そのうちの最小値をこれら二つの構造の相違度と定義した．

$$\text{相違度}(A, B) = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \sqrt{(d_A(i, j) - d_B(i, j))^2}}{n^2} \times 100 \quad (1)$$

ここで, n は部分構造のサイズ (アミノ酸残基数), $d_A(i, j)$, $d_B(i, j)$ はそれぞれ部分構造 A, B の i 番目の残基と j 番目の残基の間の距離を表わす.

2.3. 構造クラス分類

ある一群のタンパク質部分構造 (共通の配列パターンを持つもの) を対象に, 全てのペア間の相違度を求め, 相違度行列を生成する. 例えば, 表 3 は図 3 に示す四つの部分構造に対する相違度行列の例である. ここである閾値 (例えば 100) を設定すれば, その閾値以内の構造同士は同じクラスに属し, それより大きいもの同士は別々のクラスに属するものとみなすことができる. クラスの選択に際しては, 行列の各行ごとに閾値以内となる要素数を数え上げこれが最大となるもの (同数となる候補が複数存在する場合は, その相違度の和が最小となるもの) から優先して決定した.

閾値の与え方により結果として得られる構造クラスの数やサイズは異なるが, 適切なクラス分けとなるような閾値をあらかじめ決定しておくことは難しい. そこで本研究では, ある指定した範囲内で閾値を変化させ, その結果得られるクラスの情報を一覧表示するユーザインターフェース・プログラムを実装し, 対話的にクラス分類を行なえるよう工夫した.

2.4. 代表幾何パターンの決定

以上によりいくつかの構造クラスが得られたら, 次に各クラスを代表する一つの三次元幾何パターンを決定する. 本研究では, 各部分構造について, 当該クラス中の他の全ての部分構造との相違度の和を算出し, その合計値が最小となるものをそのクラスの代表パターン (すなわち, クラスの情報を反映する最も平均的な三次元構造) であると定義した. 表 3 の例の場合, A・C・D の三つの部分構造が属するクラス(1)の代表パターンは D, クラス(2)については B (自明) と決定される.

3. 結果および考察

PDB (Rel. #89) から, Hobohm らの代表データセットのリスト [Hobohm 92] を参考に抽出したタンパク質テストデータセット (902 鎖) に対して, PROSITE (Rel. #16.0) 中の全パターン (ただし, N-, C-両末端の終端指定子を含む特殊なパターンは除外) 1,299 件を対象に Multi-Multi モードによる三次元構造モチーフ辞書の作成実験を試みた. その結果, 少なくとも一つの三次元部分構造がヒットした配列モチーフは 464 件であった. 次に, このうち対応部位数が 3 ~ 50 のものについてクラス分類-代表パターン選出実験を引き続き行なった.

例えば EF-hand モチーフ (ID PS00018) に対応する部位は延べ 12 個 (一つのタンパク質構造中に複数のモチーフ

図 3 比較する四つの三次元部分構造 (EF-hand モチーフ対応部位の一例)

表 3 相違度行列による構造クラス分類結果例

	A	B	C	D
A	0	811	64	62
B	811	0	802	786
C	64	802	0	53
D	62	786	53	0

* クラス(1): A, C, D, クラス(2): B
(閾値 100 の場合)

部位がヒットするものも含む) 検索され (表 4), 閾値 100 を与えたときこれらが四つの構造クラスに, 200 のとき三つのクラスにそれぞれ分類された. また, 閾値 300 ではその分類結果は 200 の場合と等価であり, 次に変化があったのは閾値 800 を与えたとき (2 クラス) であった. また閾値 1000 で全体が一つのクラスとして認識された. ここでは, この閾値の間隔に注目し, 3 クラスに分類されたケースについてみると, 第 1 のクラスには 10 個の部分構造が属し, その代表パターンは 2SCPA (D104-Y116) と決定された. 一方, 他の二つのクラスはいずれも属する部分構造が一つのものであった. これら (1GAI (D403-L415) 及び 1GOH (D75-V87)) について調べると, そのタンパク質の機能や周辺環境 (カルシウムイオンや, E, F と呼ばれる前後の二つのヘリックスの存在 [Branden 91, Kretsinger 80]) から, 本モチーフに該当しないノイズ成分であったことが確認できた.

表 4 テストデータセットに対する EF-hand モチーフの検索結果

PDB ID	対応部位	タンパク質
1ALVA	D 150 - F 162	Calpain
1ALVA	D 180 - L 192	Calpain
1GAI	D 403 - L 415	Glucoamylase-471
1GOH	D 75 - V 87	Galactose oxidase
1PSRA	D 62 - F 74	Psoriasin
1REC	D 110 - V 122	Recoverin
1SRA	D 257 - W 269	Sparc
2PVB	D 51 - L 63	Parvalbumin
2PVB	D 90 - F 102	Parvalbumin
2SCPA	D 16 - F 28	Sarcoplasmic calcium-binding protein
2SCPA	D 104 - Y 116	Sarcoplasmic calcium-binding protein
2SCPA	D 138 - F 150	Sarcoplasmic calcium-binding protein

4. まとめと今後の課題

本研究では PROSITE 中で定義された配列モチーフに対応する三次元部分構造の集積・分類のためのプログラムを開発し、テストデータセットを用いた三次元モチーフ辞書の作成を試みた。特に、EF-hand モチーフの例では構造クラス分類の結果、ノイズ成分を除去した主要クラスが生成され、その代表幾何パターンを得ることができた。これら分類結果は閾値の設定に大きく依存するため、合理的な閾値の決定に関して引き続き検討を行っている。今後は、得られた部分構造（特に代表パターン）を基礎とし、別途開発した三次元モチーフ検索プログラムを用いてタンパク質構造データマイニングのための三次元構造特徴辞書の作成を進めるとともに計算機実験を通じてその有用性を明らかにしたい。

謝 辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金・特定領域研究(B)「アクティブマイニング」のもとに行われたものであることを明記して謝意を表する。

参考文献

- [Bairoch 91] Bairoch, A.: PROSITE: a Dictionary of Sites and Patterns in Proteins, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 19, pp. 2241-2245 (1991).
- [Bernstein 77] Bernstein, F. C., *et al.*: The Protein Data Bank: a Computer-based Archival File for Macromolecular Structures, *J. Mol. Biol.*, Vol. 112, pp. 535-542 (1977).
- [Branden 91] Branden, C. and Tooze, J.: *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, New York (1991).
- [Bron 73] Bron, C. and Kerbosch, J.: Finding All Cliques of an Undirected Graph, *Comm. ACM*, Vol. 16, pp. 575-577 (1973).
- [Gribskov 91] Gribskov, M. and Devereux, J.: *Sequence Analysis Primer*, Stockton Press, New York (1991).
- [Hobohm 92] Hobohm, U., Scharf, M., Schneider, R. and Sander, C.: Selection of Representative Protein Data Sets, *Protein Sci.*, Vol. 1, pp. 409-417 (1992).
- [金久 97] 金久實: *ヒューマングノム計画*, 共立出版 (1997).
- [Kato 97] Kato, H. and Takahashi, Y.: Three-Dimensional Structural Feature Search of Proteins, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Vol. 70, pp. 1523-1529 (1997).
- [Kato 01] Kato, H. and Takahashi, Y.: Automated Identification of Three-Dimensional Common Structural Features of Proteins, *J. Chem. Software*, Vol. 7, pp. 161-170 (2001).
- [Kretsinger 80] Kretsinger, R. H.: Structure and Evolution of Calcium-Modulated Proteins, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, Vol. 8, pp. 119-174 (1980).
- [Kuhl 84] Kuhl, F. S., Crippen, G. M. and Friesen, D. K.: A Combinatorial Algorithm for Calculating Ligand Binding, *J. Comput. Chem.*, Vol. 5, pp. 24-34 (1984).
- [中村 95] 中村春木, 中井謙太: *バイオテクノロジーのためのコンピュータ入門*, コロナ社 (1995).
- [Sayle 95] Sayle, R. A. and Milner-White, E. J.: RASMOL: Biomolecular Graphics for All, *Trends Biochem. Sci.*, Vol. 20, pp. 374-376 (1995).
- [Thornton 89] Thornton, J. M. and Gardner, S. P.: Protein Motifs and Database Searching, *Trends Biochem. Sci.*, Vol. 14, pp. 300-304 (1989).

〔担当委員：松本裕治〕

2002 年 3 月 1 日 受理

著 者 紹 介

加藤 博明（正会員）

1998年豊橋技術科学大学大学院工学研究科機能材料工学専攻博士課程修了。現在豊橋技術科学大学知識情報工学系助手。博士（工学）。分子情報工学，特にタンパク質構造情報処理に関する研究に従事。日本バイオインフォマティクス学会，日本コンピュータ学会，日本化学会 各会員。

田所 哲男

2001年豊橋技術科学大学大学院工学研究科知識情報工学専攻修士課程修了。同年（株）日立製作所入社。

宮田 博之

2001年豊橋技術科学大学工学部知識情報工学課程卒業，現在同大学大学院工学研究科知識情報工学専攻修士課程在学中。

近松 信一

2002年豊橋技術科学大学工学部知識情報工学課程卒業，現在同大学大学院工学研究科知識情報工学専攻修士課程在学中。

高橋 由雅（正会員）

1978年山梨大学大学院工学研究科発酵生産学専攻修士課程修了。現在豊橋技術科学大学知識情報工学系教授。農学博士。分子情報処理アルゴリズム，特に分子の構造類似性の定量的評価手法に関する研究に従事。

日本バイオインフォマティクス学会，米国化学会，日本化学会，日本薬学会 各会員。

阿部 英次（正会員）

1972年東北大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了。現在豊橋技術科学大学知識情報工学系教授。化学情報学，特に NMR スペクトルデータベース管理システムの構築ならびにその応用に関する研究に従事。理学博士。情報処理学会，米国化学会，日本化学会，科学教育学会 各会員。