

アミノ酸周期性を用いた新規核酸結合蛋白質の網羅的予測

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科

BI プログラム修士課程 2 年

藤島皓介

研究概要

様々な生物のゲノムプロジェクトを受けて、プロテオームを構成する各蛋白質の機能解析が 21 世紀の重要な研究課題となっている。しかしながら、ゲノム情報から推定される蛋白質の約半分近くは未だに機能が明らかにされていないのが現状である。さらに種固有なものをはじめとする既知の蛋白質と相同性を有していないような蛋白質においては、その機能を明らかにする手法を模索している状況にある。我々はまず、生命の遺伝情報を担う DNA や生体内の様々なプロセスに関与することが明らかとなった RNA といった核酸の制御に関わる新規の蛋白質を網羅的に取得することを目的に、アミノ酸の一次配列上に存在する特定のアミノ酸の周期性に着目した核酸結合蛋白質予測法を開発した。また、本研究では実験的検証(本大会小正らの発表を参照)を鑑み生化学的な解析に長けた超好熱性古細菌 *Pyrococcus. furiosus* をモデル生物とした。*Pyrococcus. furiosus* は 100℃ 近い高温に生息し、原始生命に最も近い生物種の一つであると言われている。そのため保有している核酸結合蛋白質には生命というものを機能させる上で非常に重要な蛋白質が数多く眠っていると考えられる。

研究成果

アミノ酸周期性の定義

まず、20 種類のアミノ酸を電荷、疎水性、構造、機能など 8 種類の特性に基づきアミノ酸の重複を含んだ 23 種類のグループに分類した。次にそれぞれのグループがアミノ酸配列上に周期的に出現する割合を 2 から 20 の周期幅で計算した。その際 *P. furiosus* 由来の 939 個の機能既知蛋白質群に対して Effect size という指標を用いて核酸結合蛋白質を効果的に分類するアミノ酸のグループとその周期を調べた。その結果、電荷を持つアミノ酸、特に正電荷アミノ酸(リジン、アルギニン、ヒスチジン)の有する特定の周期が核酸結合蛋白質のアミノ酸配列に顕著に存在することが確認された。さらに、この特徴を用いて新規の核酸結合蛋白質を分類するために、8 種のアミノ酸グループ(ほとんどが正電荷を有するアミノ酸より構成される)とその周

期を抽出し,これらを統合することで Periodicity (PD) スコアという尺度を新たに定義した. PD スコアを *P. furiosus* の機能既知蛋白質に適用した結果,リボソーム蛋白質群をはじめとした多くの核酸結合蛋白質がスコア上位を占め,逆に核酸に結合しない蛋白質は低い PD スコアを有する傾向があることが確認された(図1).

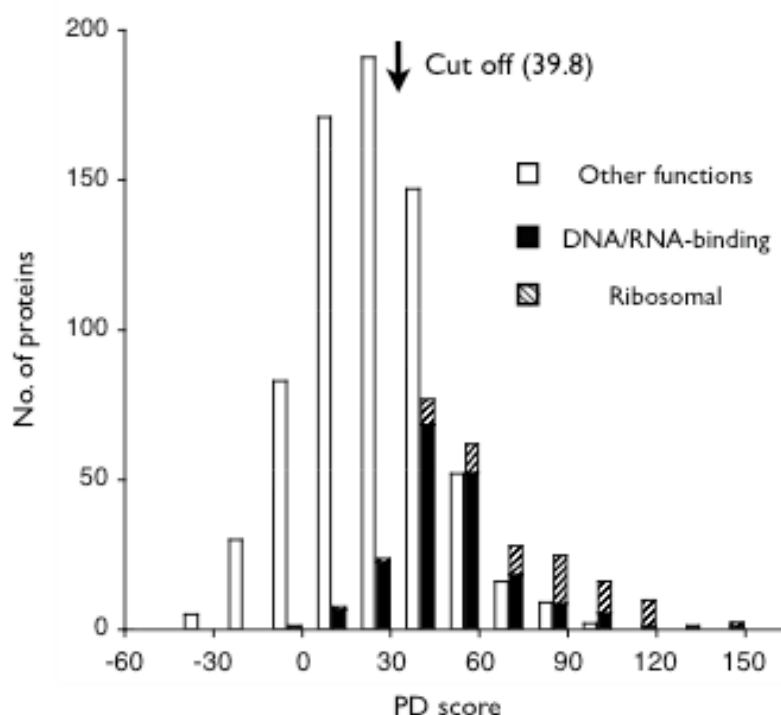


図1:核酸結合蛋白質とその他の蛋白質における PD スコアの分布

新規核酸結合蛋白質の予測及び同定

さらに,この手法を同古細菌の機能未知蛋白質 1008 種に適用した結果,最終的に 79%の精度で,新規の DNA/RNA 結合蛋白質候補 199 種を予測することができた.これらの蛋白質には,核酸に関連する機能ドメイン等の情報を一切もたない蛋白質も含まれており,我々の手法がこのような機能未知蛋白質からの予測に適していることを示している. さらにこれらの蛋白質が実際に DNA 及び RNA といった核酸に結合するかを調べるために生化学的実験手法を用いた実験を行った. まず, 複数の構造を有するような DNA/RNA プローブを作成した(図 2A). そのプローブを用いて核酸結合性があると予測した蛋白質 13 個及び結合性が無いと予測された蛋白質 4 個に対してゲルシフト法と呼ばれる結合アッセイを行った. その結果,核酸結合性が有ると予測された 13 個の蛋白質のうち 10 個に核酸結合性があることが確認された(図 2B). 興味深いことにこれらの蛋白質のうちいくつかは高温下でより強い結合性を有する事が確認された(図 2C).また最も PD スコアが高い PF1498 という蛋白質はゲルシフト法では核酸

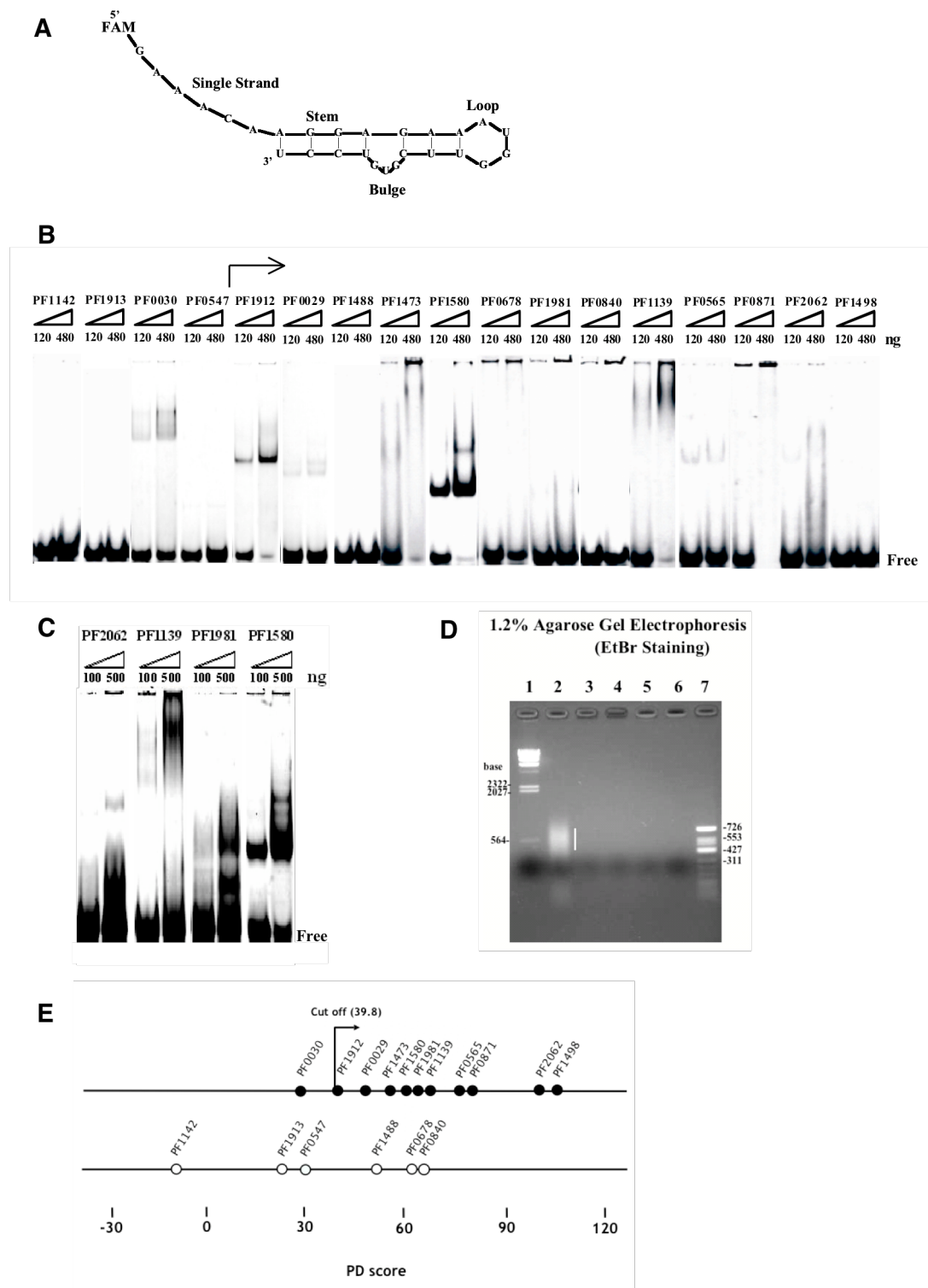


図2: *P. furiosus* において予測された新規核酸蛋白質候補に対する核酸結合能の確認

結合性が確認できなかったが、電気泳動及び EtBr 染色によってすでに大量の核酸と複合体を形成していることがわかった(図 2D). 核酸結合性と PD スコアの関係をチャートにしたものが図 2E である. PD スコアの高い蛋白質がより核酸結合性を有していることが確認できた.

結論

蛋白質のアミノ酸配列に潜む新たなルールを発見し, それに基づいて世界ではじめて機能未知蛋白質からの網羅的な核酸結合蛋白質の予測を可能にした. さらにそれらの候補蛋白質に関して実際に核酸結合性があることを証明した.

謝辞

本研究を行う上で森泰吉郎記念研究振興基金による援助は円滑に解析を進める上で非常に大きな助けとなった. ここに感謝を述べたい.

論文投稿

本論文は世界的な国際科学誌である Nature Biotechnology 誌へ 2005 年 7 月に初投稿した. 一次の査読審査をパスし, revised paper を 2005 年 11 月に再投稿したが最終選考を通過することはできなかった. 2006 年 3 月には別の科学雑誌 Genome research に初投稿を行い, 現在も論文審査中である

研究成果発表

2005 年度はコスタリカで行われた国際学会 International Society of Molecular Evolution meeting 及び福岡で行われた第28回日本分子生物学会にて本研究を発表した(以下参照)

1. K. Fujishima, Mizuki Komasa, Sayaka Kitamura, Haruo Suzuki, Masaru Tomita & Akio Kanai (2005) Proteome-wide prediction of novel DNA/RNA-binding proteins using amino acid periodicity in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. International Society of Molecular Evolution meeting, Punta Leona, Costa Rica
2. 藤島皓介、小正瑞季、北村さや香、鈴木治夫、金井昭夫、富田勝 (2005) アミノ酸配列の周期性を用いた核酸結合蛋白質の網羅的予測 日本分子生物学会第 28 回大会 福岡