

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21113007

研究課題名(和文)タンパク質天然変性状態の情報基盤の確立と展開

研究課題名(英文)Development and application of a database of intrinsic protein disorder

研究代表者

太田 元規(Ota, Motonori)

名古屋大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：40290895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 94,200,000円、(間接経費) 28,260,000円

研究成果の概要(和文)：生理的条件下であっても孤立状態では立体構造を保持しないタンパク質があり、それらは天然変性タンパク質と呼ばれている。天然変性タンパク質は90年代に着目されたため情報は豊富とは言えないが、転写活性やシグナル伝達など重要な高次機能に関連している。そこで、これらについて、質・量ともに充実したデータベースを作成することで研究基盤の確立を図った。UniProtとPDBのデータを出発点とし、アノテーションの仕組みやツールを整えながら、人の手を介したデータ収集を実施し、IDEALデータベースを構築、公開した。天然変性領域に含まれる機能部位をProtean segmentとして積極的に登録した。

研究成果の概要(英文)：Intrinsically disordered proteins (IDPs) are those that do not adopt their unique tertiary structures under physiological condition, if isolated from their binding partners. The structural and functional information for IDPs are not adequate enough, because they have been paid attention recently. They play significant roles in the translational activation or signal transduction. Construction of qualified database is mandatory to the deep understanding of IDPs. We have developed IDEAL database using the information of UniProt and PDB as the starting point. We arranged manual-annotation procedures and devised several data-handling tools. From the November 2011, IDEAL is open to the public. Especially, it presents functional regions in disordered regions that exhibit disorder-order transition upon binding of interaction partners, as protean segments.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：データベース バイオインフォマティクス 構造・機能予測 変性とフォールディング

1. 研究開始当初の背景

天然変性タンパク質は生理的条件下にあっても立体構造を形成しないタンパク質であり、立体構造をとまわらない部位：天然変性領域を含んでいる。天然変性領域はタンパク質の全長にわたるもの、全長とは言わないまでも長大なもの、部分的なもの多岐にわたる。天然変性タンパク質の特徴は、天然変性領域を利用して他のタンパク質等と相互作用し機能を発揮するところにある。このような現象は、90年代後半に発見され、それ以降研究が盛んとなった。天然変性タンパク質の存在は以前から認識されてきたが、機能等が不明だったため、論文等で報告があっても、組織的な情報の整理は行われていなかった。天然変性タンパク質は、シグナル伝達や転写制御といった重要な細胞現象に関与しており、その機能を理解することは高等生物の高次機能解析に非常に重要である。そこで、天然変性タンパク質の情報を収集し、データベース化することが求められていた。先行研究として DisProt というデータベースが構築、公開されているが、基本的には人が閲覧するためのデータベースであり、かつ、網羅的な情報収集を意図したためか、広汎ではあるがりとあらゆる雑多なものが集約されているという印象であった。我々は、それがいかなるものであれ、ある立場から標準化されたデータベースが、科学研究のインフラストラクチャとして必須であると考えた。また、データが発表されるのをただ待っているだけでなく、積極的に実験環境を整備し、データを提出していく仕組みを整備することも重要と考えた。

2. 研究の目的

データの質、量、ともに充実した天然変性タンパク質のデータベースを構築、公開し、天然変性タンパク質研究の基盤を提供する。質という意味では人の手を入れ、あるていど標準化されたデータを提供する。量という意味では、実験による天然変性領域同定の仕組みを研究、開拓し、積極的に実験結果を取り入れていく。天然変性領域にはタンパク質との相互作用部位が存在し、この相互作用はシグナル伝達や転写制御におけるスイッチのような役割を果たすことが多い。また、この部位の特徴として、同一部位であっても、形も機能も異なる多くのタンパク質と相互作用することがあげられる。このような現象はプロミスキャスな相互作用として知られているが、相互作用様式等、研究が進んでいない。こういった相互作用する機能部位を中心に据え、データを収集する。立体構造の情報は PDB に統合され、整理した形で提供され容易に入手できるが、天然変性タンパク質についてはこのようなデータベース化が実現されておらず、研究の大きな妨げとなっている。本研究で開発するデータベースは、天然変性領域の相互作用部位やパートナー情報を注

釈付けすることで、分子レベルで、天然変性タンパク質の機能様式を解明するための、インフラストラクチャを整備することにある。

また、データベース構築のみに留まらず、天然変性タンパク質の特徴を解明するために、データベース研究、シミュレーション研究、実験研究を推進する。

3. 研究の方法

データベース作成においては、天然変性タンパク質に関する様々な情報を収集する必要がある。Uniprot は、アミノ酸配列をベースに様々な既存のデータベースへのリンクが整備されており、情報収集の出発点として適している。また、本データベースでは積極的に天然変性領域の相互作用部位を収集することにしたが、精度の高い相互作用部位として複合体として立体構造が決定された領域を参照することが出来る。天然変性領域の情報は X 線結晶解析の構造が決定されない領域(ミッシング領域)として入手可能である。このような理由から、Uniprot のエントリで立体構造が決定され PDB に登録されたものを出発点とした。PDB から取得困難な天然変性領域の情報は、文献情報を収集、読解することで補う。天然変性タンパク質は、真核生物、特に核内タンパク質に多いため、ヒトの核内タンパク質で上記基準を満たすものからアノテーションを開始した。アノテーションを行うにあたり、専用の既知情報を概観できるツールやその結果を示す掲示板等を作成し、情報整理の効率化をはかった。天然変性領域上の機能部位は、protean segment (ProS) というカテゴリをもうけ、特別にアノテーションを行った。

データベース開発以外の研究の方法については、研究成果の欄にあわせて記載した。

4. 研究成果

1) 天然変性タンパク質データベース、IDEAL の開発：2009 年にデータベース開発チームを発足し、開発や公開に利用するマシンを整えた。DisProt のサーベイを行い、どういったデータベースを作成すべきかの方向付けを行い、大まかな仕様について検討した。2010 年より「3. 研究の方法」で述べたようなやり方で本格的な開発に着手し、データベース IDEAL を 2011 年の 11 月にインターネットにより公開した (<http://www.ideal.force.cs.is.nagoya-u.ac.jp/IDEAL/>)。公開に際し、天然変性領域・構造領域等が直感的に理解できるよう、アミノ酸配列を帯で表現し、各部位を色別表示するよう、インターフェースに工夫をこらした。2011 年 11 月の段階でアノテーションしたタンパク質は 153、ProS を含むタンパク質は 72 であった。この成果は論文として、NAR 誌に掲載された。IDEAL のデータは、UniProt や PDB のデータに基づいているため、IDEAL のデータ更新を行う際もこれらのデータベースの更

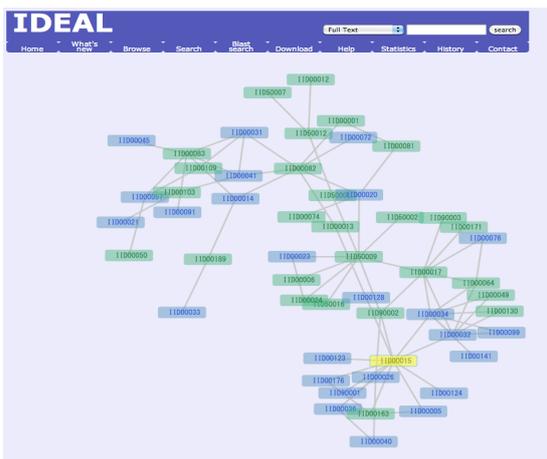


図1：IDEAL が提示するネットワーク図

新を十分に反映したものでなくてはならない。データ更新を行うための作業工程を整備し、また、それに利用するツールやスクリプトを整備し、2012年5月、2012年12月にデータの更新を行った。登録されたタンパク質(ProSを含むタンパク質)は、209(97),261(121)と順調に増加した。

2011年に公開したIDEALは、各エントリ(タンパク質)について個別にアノテーションされた情報を表現することに意識があったため、天然変性タンパク質の特徴であるプロミスキャスな相互作用を伝えるには物足りない部分があった。この点を修正するためにIDEALを改訂することを計画し、その結果、2013年8月にはインターフェースの大幅な見直しなどを行ったバージョンを公開した。これまで以上に相互作用パートナーのタンパク質情報の取得を容易にしたのと併に、PDBに収録された立体構造情報の非冗長化、NMRにより立体構造が決定されたエントリからの天然変性領域領域のアノテーション(下記参照)、タンパク質相互作用ネットワークの提示(図1)を行い、利便性の向上をはかった。2013年8月、2014年3月にデータ更新を行った結果、登録されたタンパク質(ProSを含むタンパク質)は、340(148),446(183)となった。成果をNAR誌に論文として発表した。IDEALでは人が見てわかりやすいよう、インターフェースを工夫しているが、その一方で、データをダウンロードしてコンピュータに入力し、解析研究が実施しやすいよう、XML形式を採用している。

登録したProSを観察し、天然変性タンパク質の相互作用様式の傾向を調査した。同一構造ドメインに結合するProSの場合、コンセンサス配列が見られる場合もあるが、全く異なる様式で結合することもある。また、同一の天然変性領域に異なる構造ドメインが結合するときも、結合に共通性が見られることもある。ProSの配列保存性にも様々な様式がある。これらの傾向



図2：CARMIL結合が抑制するCPのドメイン運動の例(赤と灰色が剛体)

についてはデータの増加を図りつつ、更に探求する。

2) NMR構造に基づく天然変性領域同定：PDBに登録されたタンパク質を調べると、X線結晶構造解析は細胞質のタンパク質の構造決定に利用されることが多いのに対し、核内タンパク質についてはNMRが良く利用されている。天然変性タンパク質は核内タンパク質に多いため、PDBを利用するにしてもNMRの情報を取り込むことができないと片手落ちになる可能性がある。そのため、NMRの立体構造を利用した天然変性領域の同定法を考案した。X線でもNMRでも構造決定が行われているタンパク質を選定し、X線構造のミッシング領域を同定した。NMR構造では、通常複数モデルが登録されているのでその揺らぎを計算した。ミッシング領域と一番相関が高くなるように揺らぎの値を決めると、3.2Åになった。これをNMR構造に適用し、X線構造から得られた天然変性領域と比較し、それらの違いについて議論した。この同定法で得られた結果を、2014年のIDEAL改訂時に反映させた。

3) 天然変性タンパク質、CARMILによるアロステリック阻害機構：CARMILは全長1200ほどのアミノ酸配列からなるタンパク質で、C末側300残基ほどが天然変性領域である。この部分でアクチンキャッピングタンパク質(CP)に結合し、CPとFアクチンの相互作用を阻害する。X線結晶構造解析の結果からCPとFアクチンの相互作用面と、CPとCARMILの結合面が異なることがわかっていて、つまり、CARMILはCPをアロステリックに阻害する。CARMILがCPに結合するとCPの動的構造変化を引き起こし、阻害がおきるという仮説が提案されている。このメカニズムを解明するために、CP、CP/CARMIL複合体などの分子動力学計算を実施し、動的構造を調査した。MotionTreeで解析したところ、CARMIL結合で抑制されるドメイン運動を同定した(図2)。天然変性領域が相互作用パートナーの揺らぎを調整するメカニズムを提唱した。

4) 実験による天然変性タンパク質研究：天然変性領域をNMR試料として得るための発現系の構築・検討を行った。天然変性領域のモデルとしてアミロイドβ(Aβ)ペプチドを

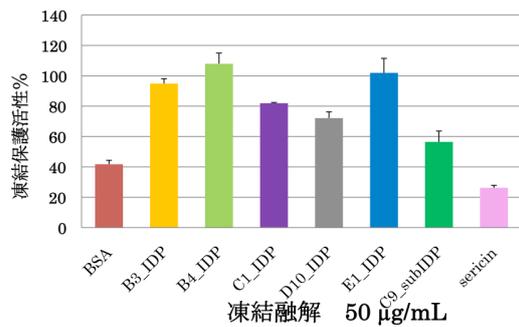


図 3：天然変性タンパク質の凍結保護活性 (黄色—緑の6種)

用いた。溶解度が高いことで知られる MBP やユビキチンとの融合タンパク質として大腸菌で可溶性画分に発現させたが、多くがプロテアーゼの分解を受けてしまった。コドン最適化されたヒトユビキチン融合発現系を用いて 37°C で発現誘導を行うと、Aβ の融合タンパク質は不溶画分として発現された。これを変性・巻き戻しを経て試料を調製することで、収量は 10 倍以上増加した。この系を利用して、Aβ (1-42) 上の特定のアミノ酸のみを ¹⁵N 標識した試料の作成にも成功した。大腸菌の不溶性画分を積極的に利用する発現系が有効であることが分かった。

ついで、天然変性タンパク質と豚コレラウイルス由来プロテアーゼ N(pro) との融合発現系を構築し、大腸菌封入体内で発現させ効率よく可溶化したのち、タグ除去と精製を可能にした。N(pro) 発現系は Auer らが開発した医療用ペプチドに最適化された系であるが、我々はこれを天然変性タンパク質用に応用した。オリジナルでは、タグの自己切断後の精製が逆相 HPLC 精製のステップとなるため、試料の脱塩・濃縮が必要であるが、これを簡便にすべく、透析法を用いた新しい refolding 条件と試料精製プロトコルを確立した。

ヒトゲノム由来の複数の天然変性タンパク質に着目し、タンパク質の凍害を保護する活性を見出した。モデル酵素として乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) を採用した。リン酸緩衝液中で液体窒素と氷水で 5 回凍結融解を繰り返すという実験に対し、天然変性タンパク質を添加し、LDH の残存酵素活性を測定した。調査した全ての天然変性タンパク質に、LDH の凍害失活を防ぐ活性が認められた (図 3)。配列の類似性から、凍結保護活性はアミノ酸配列に由来するものではなく、天然変性タンパク質に普遍的な性質である可能性が示唆された。この性質は医療・産業上の有用性が高いと考えられたため、「ヒトゲノムに含まれる天然変性タンパク質のすべて」を請求範囲とする特許を出願した。

領域内の天然変性タンパク質研究を促進するために、石野班と共同研究を行い、ヒト nucleolin (C23) の C 末端部分の GAR ドメイン

(glycine と arginine に富む天然変性領域を含む領域) が nucleolin と NVL2 のタンパク質間相互作用を増強する活性をもつことを見出した。膜融合タンパク質を用いた PRESAT ベクターによる天然変性実証系を用いて、核内因子 Hef ならびに FANCM の天然変性領域の検証を行った。ヒト FANCM の天然変性領域に結合する因子 RNaseH1 の研究を進めた。伊倉班と、タウタンパク質による微小管安定化機構の分子病態に関する共同研究を行い、タウの微小管安定化に際し、タウの微小管チューブリン上の結合部位が、微小管切断酵素カタニンの認識部位と空間的にオーバーラップしていることを発見した。また、伊藤班とは、膜制御因子 Fer の FX ドメインの立体構造解析を行い、結晶構造の決定に成功した。領域外研究者であるが、岡山大学・阿保博士と大腸菌 ArfA の共同研究を進め、¹⁵N 標識試料を用いた NMR 実験により ArfA はほぼ全領域が天然変性であることを確認した。

ProS とタンパク質ドメインの相互作用について、いくつかのタンパク質ドメインの構造解析研究・NMR 研究を進めた。神経ホルモンペプチド VIP の生体膜模倣環境での NMR 構造決定、酵母 Doa1 の PFU-PUL ドメインにおける長いリンカー部分による自己阻害様式の解明、ヒトストマチン SPFH ドメインの NMR 解析、等を実施した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 32 件)

- ① S. Fukuchi, H. Hiroaki, M. Ota et al., IDEAL in 2014 illustrates interaction networks composed of intrinsically disordered proteins and their binding partners, *Nucleic Acids Res.*, 査読有, 42 巻, 2014, D320-D325, DOI:10.1093/nar/gkt1010
- ② M. Ota, H. Hiroaki, S. Fukuchi et al., An assignment of intrinsically disordered regions of proteins based on NMR structures., *J. Struct. Biol.*, 査読有, 181 巻, 2013, 29-36, DOI: 10.1016/j.jsb.2012.10.017
- ③ S. Fukuchi, H. Hiroaki, M. Ota et al., IDEAL: intrinsically disordered proteins with extensive annotations and literature, *Nucleic Acids Res.*, 査読有, 40 巻, 2012, D507-D511, DOI:10.1093/nar/gkr884
- ④ S. Takeda, M. Ota et al., Actin capping protein and its inhibitor CARMIL: how intrinsically disordered regions function, *Phys. Biol.*, 査読有, 8 巻, 2011, 035005, DOI:10.1088/1478-3975/8/3/035005
- ⑤ S. Fukuchi et al., Binary classification of protein molecules into intrinsically disordered and ordered segments, *BMC Structural Biology.*, 査読有, 11 巻, 2011, 29, DOI:10.1186/1472-6807-11-29

- ⑥ H. Hiroaki, et al., A Simplified Recipe for Assigning Amide NMR Signals Using Combinatorial ¹⁴N Amino Acid Inverse-Labeling, J Structural Functional Genomics., 査読有, 12 巻, 2011, 167-174, DOI:10.1007/s10969-011-9116-0
- ⑦ S. Fukuchi, et al., The GTOP database in 2009: updated content and novel features to expand and deepen insights into protein structures and functions, Nucleic Acids Res., 査読有, 37 巻, 2009, D333-337, DOI:10.1093/nar/gkn855 など他 25 件

〔学会発表〕(計 106 件)

- ① T. Amemiya, H. Hiroaki, M. Ota & S. Fukuchi et al., 天然変性タンパク質データベース IDEAL の機能拡張 -PPI ネットワーク, 第 51 回日本生物物理学会, 2013 年 10 月 28 日, 京都
- ② D. Shaji, T. Amemiya, S. Fukuchi & M. Ota, Structural analysis of protean segments (ProSs) in intrinsically disordered proteins (IDPs), 第 13 回日本蛋白質科学会, 2013 年 6 月 12 日, 鳥取
- ③ S. Fukuchi, H. Hiroaki, M. Ota et al., The IDEAL database, Intrinsically disordered proteins with extensive annotations and literature, The Gordon Research Conference of Intrinsically Disordered Proteins, 2012 年 07 月 10 日, Mount Snow Resort (USA)
- ④ M. Ota et al., Actin capping protein and its inhibitor CARMIL: how intrinsically disordered regions function, The Gordon Research Conference of Intrinsically Disordered Proteins, 2012 年 07 月 10 日, Mount Snow Resort (USA)
- ⑤ 合田(天野)名都子, 太田元規, 廣明秀一他, PRESAT-vector を用いた天然変性タンパク質配列の網羅的検証系の確立, 第 10 回蛋白質科学会, 2010 年 6 月 16 日, 札幌
- ⑥ S. Fukuchi., DICHOT -An Automatic Annotation System for Folding and Unfolding Regions of Proteins, Biocuration 2010, 2010 年 10 月 11 日, お台場 など他 100 件

〔図書〕(計 1 件)

- ① 太田元規, 廣明秀一他, 藤博幸編, 講談社, タンパク質の立体構造入門, 2010, 182

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 1 件)
 名称: タンパク質凍結保存用保護剤
 発明者: 廣明秀一, 太田元規, 福地佐斗志他
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 2014-033169
 出願年月日: 2014 年 02 月 24 日
 国内外の別: 国内

- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
 ホームページ等
 IDEAL
<http://idp1.force.cs.is.nagoya-u.ac.jp/IDEAL/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田元規 (OTA, Motonori)
 名古屋大学・情報科学研究科・教授
 研究者番号: 40290895

(2) 研究分担者

福地佐斗志 (FUKUCHI, Satoshi)
 前橋工科大学・工学部・准教授
 研究者番号: 70360336

廣明秀一 (HIROAKI, Hidekazu)
 名古屋大学・創薬科学研究科・教授
 研究者番号: 10336589