

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：74408

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14687

研究課題名（和文）機械学習からの特徴抽出法を用いたホヤにおけるペプチド・受容体の分子認識機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular recognition mechanism of peptide receptors in ascidians using a feature extraction method

研究代表者

白石 慧（Shiraishi, Akira）

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・研究員

研究者番号：50710729

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らはこれまでにペプチドとGPCRとの間の相互作用を予測するPD-incorporated SVMを構築した。本研究は、「どのリガンド・受容体残基の変異が活性に関与しているのか、またその残基の違いが如何に生物毎のリガンド・受容体の多様化に寄与しているのか」を明らかにすることを目的とし、機械学習モデルから分子認識因子を抽出する手法の開発と検証を行った。その結果、複数のGPCR-ペプチドペアで相互作用に関与していることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はペプチドとGPCRの相互作用機序を明らかにすることが可能な手法を開発した。それにより、単純な配列相同性や分子系統樹解析では解釈できなかった複雑な分子認識因子に基づいた生物種の多様化の仕組みの解明という、新たな学術的分野を切り開くための解析手法を確立することが出来た。

研究成果の概要（英文）：We have constructed a PD-incorporated SVM that predicts the interaction between peptides and GPCRs. In this study, we developed and validated a method to extract molecular recognition factors from the machine learning model with the aim of clarifying "which mutations of ligand-receptor residues are involved in the activity and how the differences in the residues contribute to the diversification of ligand-receptors in each organism". As a result, we obtained results suggesting that multiple GPCR-peptide pairs are involved in the interaction.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：機械学習 SVM Gタンパク共役型受容体 GPCR 神経ペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、光・低分子からペプチド・タンパク質といった広い種類の細胞外の刺激を受容・伝達する、タンパク質であり、神経ペプチドの受容体のほとんどを占めている。特に、ペプチド受容体に関しては、GPCRだけでなくリガンドとなるペプチドに関しても多様化しており、それらが協調して多様化した背景にある分子認識機構の法則性を見出すことは、内分泌学、生殖内分泌学、進化生物学における最も重要な課題の一つでもある。また、カタユレイボヤは、脊椎動物と共通の祖先から最後に分岐した無脊椎動物であり、脊椎動物の内分泌のプロトタイプを有していると考えられる。これまでに39種の神経ペプチドが同定され、その中にはホヤ特異的な配列を持つため既知のペプチド受容体との配列相同性からは受容体を推定できない新規ペプチドも多く存在した。これまで、申請者は受容体予測法と実験手法を開発し、4種のホヤ特異的なペプチドの受容体を新規に決定してきた。それらの受容体は全生物の既知ペプチド受容体と有意な配列相同性を示さない受容体であったことから、予測器がホヤで特異的に獲得されたペプチド・受容体の相互作用に寄与する因子を学習していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、「どのリガンド・受容体残基の変異が活性に関与しているのか、またその残基の違いが如何に生物毎のリガンド・受容体の多様化に寄与しているのか」を明らかにすることを目的とし、機械学習モデルから分子認識因子を抽出する手法の開発と検証を行った。

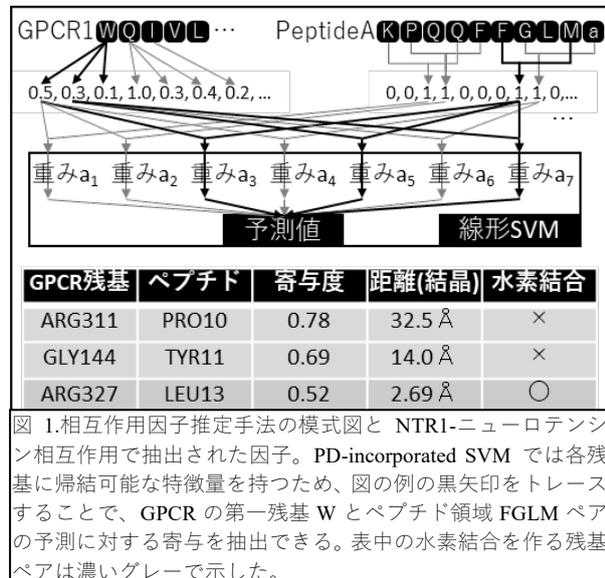
3. 研究の方法

① 相互作用予測器の予測精度改善【平成30年度】

相互作用因子抽出手法の検証に際して、ペプチド-GPCR間相互作用予測器(PD-incorporated SVM)の予測精度評価を行なった。PD-incorporated SVMは、GPCR、及びペプチドのアミノ酸配列を配列情報に帰結可能な記述子へ変換し、線形SVMを用いた予測を行うことをメインエンジンとしている。学習に際しては生物種毎に分割したデータのCross Validation評価の精度が向上するように特徴抽出を行う遺伝的アルゴリズムを含む。本手法を用いてデータベースから収集した1,352相互作用を学習し、ホヤの新規ペプチドの受容体を予測・検証した。

② 相互作用予測器からの特徴抽出手法の開発【平成31年度】

相互作用因子抽出にはアライメント上の各位置のアミノ酸のバラエティーが多いことが重要になるため、文献情報から無脊椎動物を中心に相互作用を収集し、合計2,465相互作用に増やし、再学習を行ったモデルを相互作用因子抽出に用いた。相互作用因子抽出は、PD-incorporated SVMがペプチド・GPCRの残基に帰結可能なベクトルの外積を線形SVMへの入力として予測していることを利用し、各ペプチド・GPCR残基ペアと予測モデルの重みの積が大きい値を示す残基ペアを相互作用因子として抽出した。(図1)



③ 抽出情報に基づく変異体受容体/リガンド間相互作用解析【令和2年度】

推定された因子を元に受容体-ペプチド相互作用部位の検証候補を選択する。検証は、① NTR1-neurotensin間相互作用因子推定結果とNTR1-neurotensin共結晶構造上での距離を比較すること。② Substance Pと相互作用することが近年報告されたMRGX2、[Green D. P. et al., Neuron 2019] およびMRGX2と高い配列相同性を有するが、Substance Pと相互作用しないMRGX1を対象とし、抽出されたMRGX2-Substance P間相互作用因子に含まれる残基をMRGX1に導入することで、MRGX1にSubstance P活性を獲得させること。の二点で行った。

#### 4. 研究成果

##### ① 相互作用予測器の予測精度改善

脊椎動物と最も近縁な無脊椎動物であるホヤに存在する新規(ホヤ特異的)神経ペプチド、Ci-NTLP-2、Ci-LF (6種)、Ci-YFV/L(2種)のGPCRをPD-incorporated SVMを用いて予測した。その結果、予測された28の新規相互作用ペア候補が得られ、そのうち、11相互作用が実際に相互作用することが検証できた(hit率39%)。さらに、これらのGPCRは既知のペプチド受容体と非常に低い相同性しか示さず、細胞接着因子受容体ファミリーなどの既知のペプチド性GPCRとは分子系統的にも遠縁のGPCRであることも明らかにした[Shiraishi, A. et al., PNAS 2019]。このことから、GPCRとペプチドの分子認識には既存の配列相同性や分子系統樹解析では説明できないが、相互作用の有無を規定する部位特異的機能残基(相互作用因子)があり、それらをPD-incorporated SVMが学習していることが検証できた。

##### ② NTR1-neurotensin 間相互作用因子の抽出

共結晶構造の解かれているNeurotensin 1とrNTR1受容体の相互作用で、ペプチドのC末端のY11, I12, L13と受容体のY3.29, R6.54, W2.67, G3.27, R6.38のペアが相互作用への寄与率が高いペア(相互作用因子)として抽出できた(図2A)。この抽出ペアのうち、Y3.29, R6.54とL13のペアは共結晶構造で水素結合し、膜貫通領域間を架橋していた(図2B)ことから、本手法で抽出される相互作用因子の正確性を検証することが出来た。

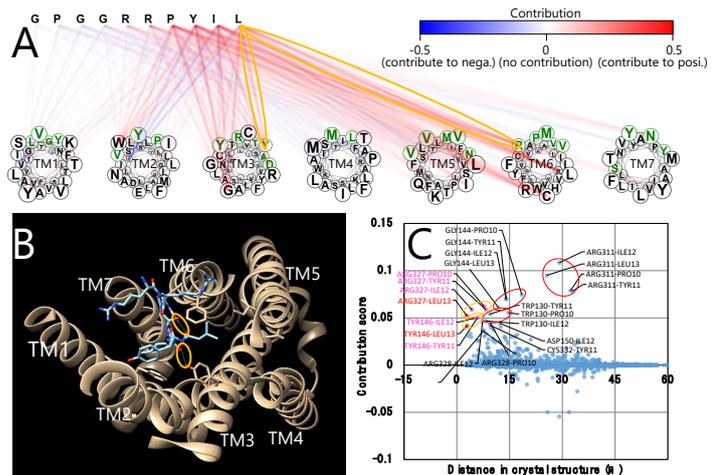


図2.(A)NTR1-neurotensin 1間相互作用因子推定結果。相互作用すると予測するのに寄与していた残基ペアを赤で、非相互作用と予測するのに寄与した残基ペアを青で結んだ。(B)NTR1-neurotensin1共結晶。水素結合を作っていたY3.29, R6.54とペプチド残基をオレンジで結んだ。(C)結晶構造上のペプチド-GPCR間残基距離と相互作用予測への寄与度。結晶構造上で遠い位置にあるが相互作用に重要であると推定された残基ペアも存在した。

##### ③ MRGX1/2-Substance P 間相互作用因子の抽出

Substance Pは、NK1Rに加えて、分子系統樹解析では遠縁のMRGX2も活性化することが知られるペプチドである。このペプチドが、NK1R, MRGX2をとともに活性化する根拠となる相互作用因子を、本抽出手法を用いて抽出し、MRGX2のP1.35, F3.24, G4.61、及びNK1RのW1.35, Y3.24F, G4.61がSubstance Pの活性の有無を決めていることが示唆された(図3A)。また、MRGX2と類縁のGPCRであるが、Substance Pを認識しないGPCRであるMRGX1では、それぞれアライメント上で相同な位置の残基がI1.35, L3.24, W4.61と、側鎖の分子量の大きく異なる残基であった。そこで、I1.35P, L3.24F, W4.61Gの3点変異を導入し、MRGX1のSubstance P活性を測定した。その結果、3点変異により、野生型MRGX1では一切見られなかったSubstance P活性が、MRGX2の40%程度のEmaxの値で得られることが分かった(図3B)。上記の結果より、本研究で構築した相互作用因子抽出法がGPCR-ペプチド間の相互作用因子を十分に説明可能であることが示された。

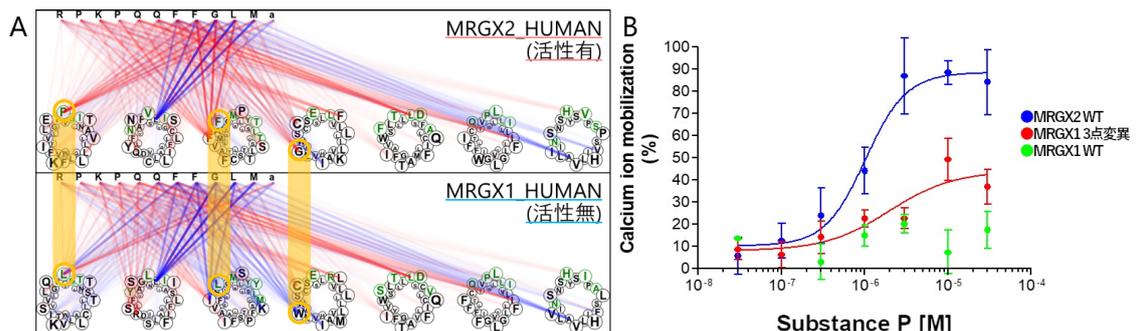


図3.(A)MRGX1/2-Substance P間相互作用因子推定結果。MRGX2相互作用因子のうち、MRGX1で側鎖の性質が大きく変化した残基をオレンジで記した。(B)MRGX1のオレンジの残基をMRGX2型に変異した変異体のCa<sup>2+</sup>応答。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akira Shiraishi, Toshimi Okuda, Natsuko Miyasaka, Tomohiro Osugi, Yasushi Okuno, Jun Inoue, and Honoo Satake	4. 巻 116 (16)
2. 論文標題 Repertoires of G protein-coupled receptors for Ciona-specific neuropeptides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 7847-7856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1816640116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白石慧 佐竹炎
2. 発表標題 機械学習を用いたGPCR-ペプチド間相互作用予測器からの相互作用機序の抽出
3. 学会等名 第8回生命医薬情報学連合大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐竹 炎  (Satake Honoo)  (20280688)	公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部   (74408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------