

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500358

研究課題名(和文) 構造変化を伴う機能性RNAのバイオインフォマティクス

研究課題名(英文) Bioinformatic study on functional RNAs with a conformational change

研究代表者

種田 晃人 (Taneda, Akito)

弘前大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：70332492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：構造変化を伴う機能性RNA配列設計のためのアルゴリズム開発を行った。本研究課題で開発した手法では、多目的遺伝的アルゴリズムを用いたことにより、複数の二次構造を安定に持つだけでなく、二次構造間のエネルギーバリアの値や、GC含量を指定した設計を、人為的な目的関数間の重みづけを行うことなしに実行できる。開発した手法の設計性能を構造変化を伴う機能性RNA配列設計のための従来アルゴリズム(RNAdesign法、Frnakenstein法)と比較したところ、同等以上の設計性能を示すことが分かった。本研究課題で開発した手法は、小分子を入力として動作する人工リボスイッチの設計に有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel algorithm for designing functional RNAs with conformational changes such as artificial riboswitches. By using the method developed in the present study, by virtue of a multi-objective genetic algorithm which was employed in the present study, we can design RNA sequences which not only have multistable structures but also have various specified features such as an energy barrier height and the GC content without empirical weight parameters among the objective functions. We compared the present method with the previous design methods (RNAdesign and Frnakenstein) and found that the present method shows comparable or better design performances compared to the previous methods.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：進化的計算 多目的最適化 RNA工学 人工リボスイッチ

1. 研究開始当初の背景

2002年のブレーカーらによる発見以来、「RNA二次構造を変化させて遺伝子の翻訳調節を行うシスエレメント」であるリボスイッチについての研究が盛んに行われている。リボスイッチは遺伝子調節メカニズムの理解のために重要であるだけでなく、人工的な遺伝子ネットワークを構築する際のセンサー・アクチュエーター部品として幅広い応用の可能性を持っており、生命機能の解明という視点からだけではなく、バイオテクノロジーの観点からもその重要性は今後さらに高まることが予想される。

2. 研究の目的

小分子(リガンド)の有無により二次構造を変化させて機能するRNA(リボスイッチ)が持ちうる特徴を指定して人工リボスイッチを設計できる、機能性RNA配列設計のためのコンピュータ援用設計手法の開発を行う。また、ゲノム配列からRNAシスエレメントの候補を予測するシステムの構築や、RNA二次構造変化経路予測法の開発も目的とする。

3. 研究の方法

(1) 構造変化を伴うRNA配列設計のためのアルゴリズム開発を以下の方針で行った。本研究課題以前に本研究課題の代表者は多目的遺伝的アルゴリズムに基づくRNA逆フォールディング(指定した二次構造を最適構造として持つRNA配列を自動的に設計する手法)の独自手法を発表しており、これを元に構造変化を伴う機能性RNA配列設計手法の開発を行う。多目的遺伝的アルゴリズムでは、人為的な重みづけを行うことなしに複数の目的関数を持つ系の最適解を探索することが可能であり、複数のリボスイッチが持つべき特徴(複数の指定された二次構造を安定に有すること、指定された配列モチーフ、エネルギーバリアの高さ等)を目的関数(設計した配列を評価する際の評価値)等として利用し、リボスイッチに特有な特徴を持つ配列の設計を行う手法を開発する。

(2) 構造変化を伴う機能性RNA配列設計のウェブブラウザを通じた実行を可能にするために、「ユーザーが指定した既知機能性RNA(アプタマーなど)の配列モチーフや二次構造をモジュール的に結合して、センサー部分の状態により機能(遺伝子発現の調節など)をスイッチする人工機能性RNA配列」を設計するためのグラフィカルユーザーインターフェース付き設計ツールを開発し、ウェブサービスとして公開する。

(3) RefSeqのデータベースから取得できる原核生物ゲノムを対象としてペアワイズ比較ゲノムを行い、リボスイッチ等の機能性RNA候補を含みうる領域を予測するシステムを構築する。

(4) リボスイッチ二次構造を特徴づけると

考えられる「エネルギーバリアに隔てられた複数の局所最適解の間の二次構造変化経路」を予測することを目指し、進化的アルゴリズムに基づくRNA二次構造変化経路予測法を独自に開発する。

4. 研究成果

(1) 複数の二次構造をターゲット構造として指定して設計を行える、構造変化を伴う機能性RNA配列設計アルゴリズムの開発に成功した。今回開発したアルゴリズムの特徴としては、様々な二次構造予測手法で予測された目的関数を用いて非常に柔軟な指定をした配列設計が可能な点、そしてNSGA2(Non-dominated Sorting Genetic Algorithm 2)アルゴリズムを用いた多目的最適化により、構造変化を伴う機能性RNAが持つべき複数の特徴を持った配列の設計を行える点が挙げられる。

目的関数としては、予測された最小自由エネルギー値、指定した二次構造と最小自由エネルギー構造との間の一致度、ボルツマンの確率、指定した二次構造の自由エネルギー値、指定した2つの二次構造の間のエネルギーバリアの上限値、設計された配列のGC含量、設計した配列を評価する際に従来用いられている集団欠陥(ensemble defect)の値、などの機能性RNA配列設計を行う際に有用と考えられるものをリストアップして実装し、容易に必要な特徴量を指定してRNA配列設計時を行えるアルゴリズムとした。

さらに、構造変化を伴う機能性RNA設計に重要な機能として、「一部の配列を指定したものに固定して設計する機能」と、「一部の二次構造を指定したものに固定して二次構造予測を行った結果を設計に反映する機能」を実装した。一部の配列を指定したものに固定して設計する機能は、リボスイッチ中の小分子のセンサー部分であるアプタマー部分の配列モチーフを指定するのに有用である。また、一部の二次構造を指定したものに固定して二次構造予測を行った結果を設計に反映する機能は、アプタマー配列が小分子と結合した際の既知二次構造を指定する際に有用である。リボスイッチ設計では、小分子が存在しない状態と存在する状態の2種類の状態を配列設計の条件として指定する必要があるが、小分子が存在する状態はセンサーとして機能するアプタマー配列部分が指定した二次構造を必ずとるとして二次構造予測を行うことで考慮することができるため、この機能はリボスイッチ設計を行う際に有用である。

今回開発した構造変化を伴う機能性RNA配列設計アルゴリズムでは、独自開発の遺伝的アルゴリズム突然変異オペレーターや交叉オペレーターを利用することで高性能な配列設計を可能とした。一般的に遺伝的アルゴリズムによる配列設計では、ランダムに選んだ塩基をランダムに別なものへ変化する

せる処理を膨大な回数繰り返す必要がある。本研究課題では、構造変化を伴う機能性 RNA 設計で考慮する必要がある塩基配列間の複雑な依存関係を表す依存性グラフと呼ばれるグラフ構造を考慮した突然変異オペレーターと交叉オペレーターを独自開発し利用した。また、指定した性質を持つ RNA 配列を効率的に探索するために、ネガティブデザインオペレーター、ポジティブデザインオペレーターと呼んでいる新しい突然変異アルゴリズムを開発した。

本研究課題で開発した配列設計手法では、設計した配列を実験で確認する際に必要になると想定される機能として、指定した制限酵素部位などの望まれない配列モチーフを突然変異処理により除去する機能も実装した。

開発した配列設計手法の性能評価として、2つのターゲット二次構造を指定した設計、3つまたは4つのターゲット構造を指定した設計を行った。同様な設計を構造変化を伴う機能性 RNA 配列設計の従来手法である RNAdesign 法、Frnakenstein 法でも行い、設計結果の比較を行った。その結果、従来手法と同等以上の設計結果を本研究課題で開発した設計手法により得ることができた。

また、配列の一部を指定した設計を行った際の設計性能を評価するために、一部の配列を固定し2つ、3つまたは4つのターゲット構造を指定した設計を行った。その結果、2つのターゲットを指定した設計ではやや設計性能の低下がみられたが、3つ、4つのターゲットを指定した設計では一部の配列を固定しなかった場合と同程度の設計性能が得られることが分かった。

従来の構造変化を伴う機能性 RNA 配列設計アルゴリズム (RNAdesign 法、Frnakenstein 法) では実行できない設計として、2つのターゲットシュドノット構造を指定した設計、2つのターゲット二次構造を指定した人工リボスイッチ (RNA デバイス配列) 設計を行い、指定した人工リボスイッチの特徴を全て満たす RNA 配列を自動的に得ることができ、本設計手法の RNA デバイス設計アルゴリズムとしての有用性を示すことができた。

(2) 本研究課題で開発した RNA 配列設計手法をより容易に実行できる環境を開発するために、構造変化を伴う機能性 RNA 配列を多目的遺伝的アルゴリズムに基づき設計するウェブサーバシステムの開発を行った。開発したシステムでは、2つのターゲット二次構造、固定を希望する部分配列、リガンドが結合した状態を表す部分二次構造を指定し submit ボタンをクリックすると、指定した特徴を持つ RNA 配列を自動的に設計し結果を表示する。設計の程度を制御するために、遺伝的アルゴリズムの集団数を変更した設計や、GC 含量を指定した設計も可能とした。図 1 に開発したウェブサービスシステム

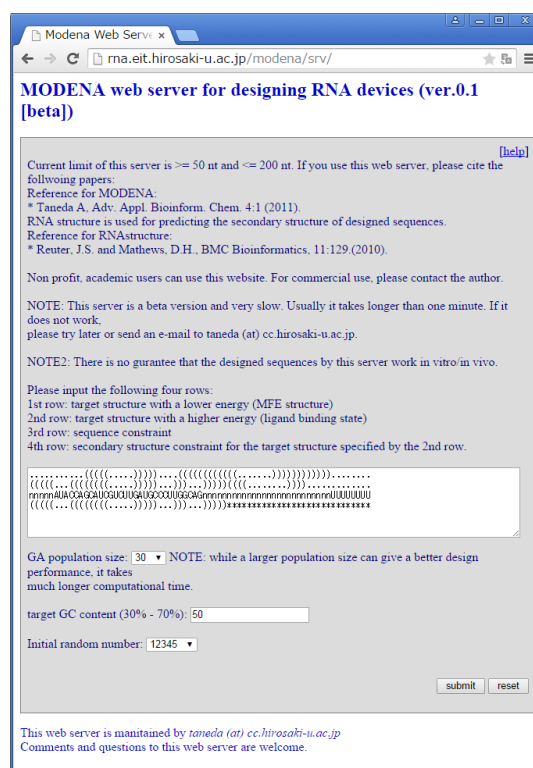
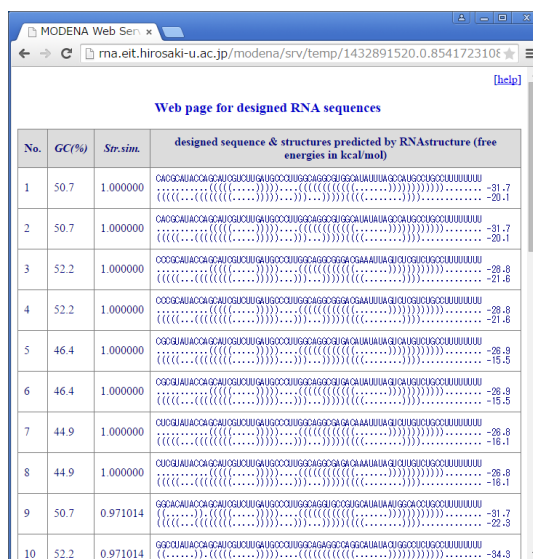


図 1 RNA 配列設計ウェブサーバ画面例



の RNA 配列の特徴を指定する画面を、図 2 に設計結果表示画面の例を示す。図 2 に示したように、遺伝的アルゴリズムでは複数の解を一度の計算で処理するため、設計された複数の配列を一度の計算で得ることができるシステムとなっている。

(3) ペアワイス比較ゲノムに基づく機能性 RNA 配列遺伝子予測により RNA システムを探索するシステムの構築とその *S. oneidensis* ならびにその近縁種ゲノム配列への適用を行った。引用文献のアプローチを踏襲して、*S. oneidensis* のタンパク質遺伝子配列をクエリとして近縁種のゲノムに対して BLAST によるホモロジー検索を行い、それぞれのクエリ配列に対してヒットした

配列群の上流にあるUTR配列をそのクエリ配列に対するUTR配列群として得た(原核生物ゲノムのUTRを調べる場合オペロンを考慮する必要があるため、引用文献の方針を参考に、同じストランド上でお互いに接近したコード領域は同じオペロンに属すると判断してUTR配列の抽出を行った)。以上のようにして抽出したそれぞれのUTR配列群に対し、Cofolga2mo法を利用して二次構造を考慮したペアワイズRNA配列アライメントを行い、統計的に有意な共通二次構造を持つ領域として複数の機能性RNA候補領域を得た(共通二次構造のスクリーンは150塩基程度のサイズのスライディングウィンドウを利用して行った)。

(4) アントコロニー最適化に基づき、指定した出発構造から終点構造までRNA二次構造を変化させた際のエネルギーバリア値(経路中の最高エネルギー値)とエネルギーバリアの低い変化経路を探索する手法を開発した。これまでに、RNA二次構造変化経路予測手法が複数発表されているが、エネルギーバリア予測問題はNP完全であることがコンドンのグループにより報告されていることから、ヒューリスティクスを用いたアルゴリズムの開発を行った。動作テストを行い、RNA二次構造が変化する様子(変化経路)やその経路の最高自由エネルギー値(エネルギーバリア値)が得られることを確認した。本研究課題で開発したRNA二次構造変化経路予測法についてはさらに改善を行い、他の手法との比較等を行った後、論文発表を行いたいと考えている。

(5) 現在、本研究課題の成果として、構造変化を伴う機能性RNAを多目的遺伝的アルゴリズムを応用して設計するバイオインフォマティクスツールについて、論文を国際誌に投稿中である。

<引用文献>

A. Taneda, *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* **4**, 1-12 (2011).

Xu, Ji, Stormo, *PLoS Computational Biology* **5**, e1000338 (2009).

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 0件)
現在論文を国際誌に投稿中。

[学会発表](計 7件)

(1) A. Taneda, Computational design of pseudoknotted RNA switch, 生命医薬情報学連合大会 2014年大会(IIBMP2014), 2014年10月2日、仙台国際センター(仙台市)

(2) Y. Ito, A. Taneda, Constraint multi-objective optimization for RNA sequence alignment, 生命医薬情報学連合大会 2014年大会(IIBMP2014), 2014年10月2日、仙台国際センター(仙台市)

(3) A. Taneda, A multi-objective genetic algorithm for multi-target RNA design, The thirteenth European Conference on Computational Biology (ECCB2014), 2014年9月8日~2014年9月10日、Strasbourg Convention Centre (Strasbourg, France)

(4) 種田 晃人, 最近の人工リボスイッチ設計の動向について, RNAインフォマティクス道場 in 札幌, 2014年8月27日、産業技術総合研究所北海道センター(札幌市)

(5) 種田 晃人, MODENA: RNAデバイス設計のためのバイオインフォマティクスツール, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月5日、神戸国際展示場1号館(兵庫県)

(6) 種田 晃人, RNA配列設計のためのアルゴリズム, RNAアルゴリズム研究会 2013, 2013年8月10日、産業技術総合研究所臨海副都心センター別館(東京都江東区)

(7) 伊藤 裕, 種田 晃人, 進化的計算を用いたRNA配列設計における遺伝的オペレーターの効果, 電気学会C部門大会, 2012年9月5日~2012年9月7日、弘前大学(青森県)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]
ホームページ等
<http://rna.eit.hirosaki-u.ac.jp/modena/srv/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
種田 晃人(TANEDA AKITO)
弘前大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 70332492