

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26330332

研究課題名(和文)糖の種類を考慮したタンパク質の糖鎖修飾予測法の開発およびデータベース構築

研究課題名(英文) Development of a protein glycosylation prediction method considering the sugar types, and construction of a glycoprotein database

研究代表者

池田 有理 (Yuri, Mukai-Ikeda)

明治大学・理工学部・専任准教授

研究者番号：30371082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖の種類を考慮したタンパク質糖鎖修飾予測法の開発を行った。糖鎖修飾を受けているタンパク質のアミノ酸配列、糖鎖修飾位置周辺の二次構造解析、糖鎖修飾位置周辺の空間的アミノ酸出現傾向解析・細胞内局在性について糖種特異的な特徴を抽出するとともに、糖種判別に利用可能なパラメータを探索し、高精度糖種判別法の開発を行った。アミノ酸配列と細胞内局在性をパラメータに用いることで、高精度で糖種判別が可能となった。

研究成果の概要(英文)：A protein glycosylation prediction method considering the modified sugar types was developed in this research. The sugar type specificities of the sequence, structure and subcellular localization of the sugar modified proteins in the Uniprot and PDB databases were extracted by the statistical analysis. The factors which were available as the parameters of the sugar type discrimination were found. A sugar discrimination method with high accuracy was developed using the protein sequence and subcellular localization.

研究分野：生命情報科学

キーワード：バイオインフォマティクス タンパク質 アミノ酸配列 二次構造 立体構造 細胞内局在 糖鎖修飾
予測法

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸やタンパク質に次ぐ『第三の生命鎖』として知られており、タンパク質の機能を制御する糖鎖修飾は生体内の多くの生化学反応に必要不可欠である。また、糖鎖を形成する糖の種類(糖種)には多くのバリエーションがあり、それぞれが特異的な生化学反応と密接に関連している。これらは発生・分化、シグナル伝達などの生命現象をはじめ、免疫不全、感染症やガンなど、ヒトの疾患とも深く関わっていることが明らかになっている。このことから、糖鎖修飾を利用してタンパク質の機能をコントロールすることにより、医薬分野や健康食品開発への応用も期待できる。適切な種類の糖鎖を標的のタンパク質へ効果的に導入するためには、糖鎖修飾の分子機構の理解が必須である。また、網羅的な糖鎖修飾情報を把握するために、高精度の糖鎖修飾予測法の開発が望まれている。

これまでに発表された糖鎖修飾予測法では、タンパク質のアスパラギン残基に結合するN結合型に関しては比較的精度の高い予測が可能であるものの、セリン残基やスレオニン残基に結合するO結合型糖鎖に関しては精度が極めて低い。また、キシロース、フコース、マンノース、ガラクトースなど多様な糖種が生体内での糖鎖機能のバリエーションを生み出しているにもかかわらず、糖種も含めて糖鎖修飾を予測できる方法は未発表であった。

以上のような背景により、我々は糖鎖修飾を受けるタンパク質のアミノ酸配列解析により、糖種特異的な糖鎖修飾の分子機構を想定した予測法の開発を行ってきた。その結果、次の予備的な実験結果を得ている。

- 1) 糖鎖修飾と分子機構が類似していると考えられる糖脂質修飾について、疎水性プロファイル解析および位置特異的アミノ酸スコアマトリクス (PSSM) によって糖脂質修飾タンパク質を高精度に判別できることを示した。
- 2) O結合型糖鎖修飾に関して、糖種によって修飾残基付近のアミノ酸出現傾向が異なることを明らかにした。
- 3) O結合型糖鎖のキシロース修飾残基付近のアミノ酸出現傾向を明らかにし、PSSMを用いることによって、5分割交差検定で88%の高精度でキシロース修飾サイトを予測できることを示した。

2. 研究の目的

糖タンパク質にはヒトの重篤な疾患と関連の深いタンパク質が多く見受けられ、糖鎖

修飾によるタンパク質機能のコントロールは難治性疾患の創薬や治療への応用も期待される。また、人工的な糖鎖修飾により機能活性を高めたタンパク質は、機能性食品開発への応用も可能である。したがって、糖鎖修飾機構の解明と糖鎖修飾サイトの網羅的機能解析は必要不可欠であり、ゲノム配列に潜む未知の糖鎖修飾サイトを予測する計算技術開発およびゲノムスケールの解析が急務である。

我々のこれまでの研究によって、キシロース等のいくつかの糖種においてはPSSMを利用した糖鎖修飾予測が可能であることを明らかにしている。本研究では、糖種特異性をパラメータとし、この糖鎖修飾予測法をさらに発展させることを目的とした。

3. 研究の方法

[1] 糖種特異的二次構造選択性解析

PDB データにO型糖鎖を含むタンパク質を対象とし、糖種ごとに糖鎖修飾位置周辺の二次構造のバリエーションを調査した。

[2] 糖鎖修飾位置周辺の立体的アミノ酸出現傾向の調査

フコースまたはN-アセチルグルコサミンの修飾を受けた糖鎖周辺の物理化学的環境を調査した。構造既知の糖タンパク質を対象に、糖鎖修飾残基および糖構成原子周辺のアミノ酸残基の出現傾向を調べた。

[3] 細胞内局在性と糖種分布の調査

O型糖鎖修飾を受けている糖タンパク質について、細胞内局在・糖鎖修飾情報をもとに、細胞内での局在化経路および糖種に応じて分類した。糖タンパク質をシグナルペプチドや膜貫通領域の有無で、細胞内在型・分泌型・シグナルアンカー型・膜貫通型の4グループに分類し、O型糖鎖修飾の糖種を調査した。

[4] O型糖鎖修飾糖種判別法への応用

O型糖鎖修飾を受けるタンパク質の糖鎖修飾位置周辺のアミノ酸配列から得られた糖種特異的アミノ酸スコアマトリクス (PSSM) および細胞内局在経路(シグナルペプチド・膜貫通領域の有無)をパラメータとし、タンパク質O型糖鎖修飾における糖種判別を行った。また、判別が難しい糖種の組み合わせを明らかにするために、各糖種総当たりの組み合わせ判別を行った。また、細胞内局在性やシグナルペプチド・膜貫通領域の有無が不明のタンパク質配列の糖種判別を行う可能性も鑑み、糖種特異的PSSMのみをパラメー

タとして用いた際の糖種判別の精度も求めた。

4. 研究成果

[1] 糖種特異的二次構造選択性解析

糖種ごとに二次構造の出現傾向に特徴が見られ、各糖を修飾する糖転移酵素の認識における二次構造の指向性が示された。O型糖鎖修飾はストランドとコイルの境目に受けやすいことがわかった。特にフコースはストランド中の最もN末端側の残基に修飾されやすいことがわかった。

一方、N-アセチルガラクトサミンとN-アセチルグルコサミンは、Uniprot ではデータ数が多いが、いずれもPDBでは1桁しかなく、二次構造・立体構造の特徴を糖種判別法に活用するには統計的有意性に乏しいといえる。

[2] 糖鎖修飾位置周辺の立体的アミノ酸出現傾向の調査

フコース修飾位置周辺には、とりわけシステインの出現傾向が高く、フコースの糖転移酵素がジスルフィド結合からなる初期構造を認識している可能性が示された。

一方、N-アセチルグルコサミン修飾ではチロシン、アラニン、バリンが高頻度で出現し、高疎水性環境の形成を明らかにした。

糖鎖認識残基の周辺に芳香族アミノ酸が存在することは、糖転移酵素や糖分解酵素にも共通しており、フコースやN-アセチルグルコサミン修飾位置周辺で見られた芳香族アミノ酸が、それぞれの糖鎖修飾の選択性に寄与している可能性が考えられた。統計的有意性が増せば、糖種判別法にも活用可能である。

[3] 細胞内局在性と糖種分布の調査

小胞体・ゴルジ体・細胞膜局在タンパク質においては、主としてフコース・キシロース・N-アセチルガラクトサミン修飾が見られた。

核・細胞質・ミトコンドリアを通る細胞内在型タンパク質においては、O型糖鎖修飾の100%がN-アセチルグルコサミンであった。

各糖種の糖転移酵素の細胞内局在性ともよく一致した結果であった。特に、アミノ酸配列情報のみでは最も判別が難しかったN-アセチルグルコサミン修飾タンパク質の細胞内局在の特異性が明らかになり、糖種判別の強力なパラメータになると考えられた。

[4] O型糖鎖修飾糖種判別法への応用

PSSMを用いた判別においては、フコース・キシロース・N-アセチルガラクトサミンの3グループ内、およびフコース・キシロース・N-アセチルグルコサミンの3グループ内

は、どの組合せにおいても成功率85%~100%の判別が可能であった。しかし、N-アセチルガラクトサミンとN-アセチルグルコサミンの組み合わせでは成功率55%と、判別精度は極めて低かった。つまり、アミノ酸配列情報のみでの判別が困難である組み合わせはN-アセチルガラクトサミンとN-アセチルグルコサミンであることがわかった。

しかし、細胞内局在性（シグナルペプチド・膜貫通領域の有無）をパラメータに加えることにより、N-アセチルグルコサミン修飾位置はN-アセチルガラクトサミン修飾位置から完全に分離することが可能となることが本研究でわかった。したがって、まず細胞内局在性（シグナルペプチド・膜貫通領域の有無）によってN-アセチルグルコサミンとフコース・キシロース・N-アセチルガラクトサミンの2グループに分類し、フコース・キシロース・N-アセチルガラクトサミン内においてPSSMからスコアを算出することにより、O型糖鎖修飾の高精度糖種判別が実現した。

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3件）

- ① Yuri Mukai, Daiki Takahashi, Keiia Inoue, Hiromu Sugita, Tatsuki Kikegawa and Kenji Etchuya (2016) Secondary structure of GPI attachment signal region monitored by circular dichroism, *Chem. Lett.*, 45, 10, 1153-1155, 査読有
- ② Yuri Mukai, Daiki Takahashi, Tsubasa Ogawa, Kota Hamada and Kenji Etchuya (2016) Study of molecular recognition mechanism in protein GPI modification: a bioinformatics analysis of interaction between GPI-anchored proteins and modification enzyme, *J. Biomech. Sci. Eng.*, 11, 15-00361, 1-7, 査読有
- ③ Kenji Etchuya and Yuri Mukai (2015) Structural characteristics around O-glycosylation sites in mammalian proteins, *J. Biomech. Sci. Eng.*, 10, 14-00249, 1-6, 査読有

〔学会発表〕（計12件）

- ① Kenji Etchuya, Tatsuki Kikegawa and Yuri Mukai, “Correlation between protein subcellular localization and sugar variation”, Proceedings of the thirteenth International Conference on Flow Dynamics (ICFD 2016), 306-307, 2016.
- ② Kenji Etchuya and Yuri Mukai, “Environment factor depending on each sugar type around O-glycosylation sites in

mammalian proteins,” The 15th European Conference on Computational Biology (ECCB 2016), The Hague, Netherlands, September 2016.

- ③ Kenji Etchuya and Yuri Mukai, “Comparative study of the sequences and structures around *O*-glycosylation sites between each sugar type in mammalian proteins,” Pacific Symposium on Biocomputing, Hawaii, USA, January 2016.
- ④ Daiki Takahashi, Hiromu Sugita, Tsubasa Ogawa, Kota Hamada, Kenji Etchuya and Yuri Mukai, “Interaction between GPI-anchored proteins and GPI transamidase” Pacific Symposium on Biocomputing, Hawaii, USA, January 2016.
- ⑤ Hiromu Sugita, Naoyuki Takachio, Noritaka Kato, Hanae Kaku and Yuri Mukai, “Comparative analysis of GPI modification mechanisms between human and plant proteins focusing on signal-peptides” Pacific Symposium on Biocomputing, Hawaii, USA, January 2016.
- ⑥ Kenji Etchuya, Hiromu Sugita, Tatsuki Kikegawa, Kota Hamada, Naoyuki Takachio, Noritaka Kato, Makoto Ohta and Yuri Mukai, “Correlation between physicochemical properties of protein signal sequence variation and subcellular transportation,” Proceedings of 15th International Symposium on Advanced Fluid Information, Institute of Flow Science, Tohoku University, pp. 86-87, 2015.
- ⑦ Kenji Etchuya and Yuri Mukai, “Interaction analysis between sugar chain and aromatic residue in mammalian protein,” 40th FEBS Congress, Berlin, Germany, July 2015.
- ⑧ Daiki Takahashi, Tsubasa Ogawa, Kota Hamada, Kenji Etchuya, and Yuri Mukai, “Functional analysis of GPI transamidase with molecular phylogenetic tree,” 40th FEBS Congress, Berlin, Germany, July 2015.
- ⑨ Hiromu Sugita, Naoyuki Takachio, Noritaka Kato, Hanae Kaku, Makoto Ohta and Yuri Mukai, “Comparative study between human and plant GPI modification mechanisms,” 40th FEBS Congress, Berlin, Germany, July 2015.
- ⑩ Kenji Etchuya, Makoto Ohta and Yuri Mukai, “Study of 3D recognition by glycosyltransferase in protein sugar

modification,” Proceedings of 14th International Symposium on Advanced Fluid Information, Institute of Flow Science, Tohoku University, pp. 92-93, 2014.

- ⑪ Kenji Etchuya and Yuri Mukai, “Structural Characteristics of Fuc Modification Sites in Mammalian Proteins,” 13th European Conference on Computational Biology, Strasbourg, France, September 2014.
- ⑫ 井上慶也, 高橋大輝, 亀卦川樹, 越中谷賢治, 向井有理, “GPI アタッチメントシグナル領域の二次構造解析,” 第 54 回生物物理学会年会, つくば, 2016 年 11 月.
- ⑬ 宮坂豪, 越中谷賢治, 向井有理, “糖転移酵素の糖選択性とタンパク質認識に関わるアミノ酸の解析,” 第 54 回生物物理学会年会, つくば, 2016 年 11 月.
- ⑭ 越中谷賢治, 向井有理, “O 型糖鎖修飾を受ける哺乳類タンパク質の構造的解析,” 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 『バイオインフォマティクス入門 (第 1 章 生命科学 編集: 向井有理)』日本バイオインフォマティクス学会編, 2015 年 8 月, 慶應義塾大学出版会

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 2 件)

名称: 位置特異的スコアの算出装置、算出方法及びプログラム、GPI アンカー修飾部位の特定装置、特定方法及びプログラム、並びに GPI アンカー修飾部位の判定装置、判定方法及びプログラム

発明者: 田中大貴, 池田有理, 佐々木貴規

権利者: 学校法人明治大学

種類: 特許

番号: 特許第 5991524 号

取得年月日: 2016 年 8 月 26 日

国内外の別: 国内

名称: GPI アンカー型タンパク質の判定装置、判定方法及び判定プログラム

発明者: 池田有理, 田中大貴, 吉澤昌朗, 池田修己, 佐々木貴規

権利者: 学校法人明治大学

種類: 特許

番号: 特許第 5773406 号

取得年月日: 2015 年 7 月 10 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 有理 (MUKAI-IKEDA, Yuri)

明治大学・理工学部電気電子生命学科・准教授

研究者番号：30371082

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

越中谷 賢治 (ETCHUYA, Kenji)

小川 翼 (OGAWA, Tsubasa)

高知尾 尚志 (TAKACHIO, Naoyuki)

永島 啓矢 (NAGASHIMA, Keiya)

濱田 康太 (HAMADA, Kota)

杉田 大夢 (SUGITA, Hiromu)

高橋 大輝 (TAKAHASHI, Daiki)

山口 拓哉 (YAMAGUCHI, Takuya)

内海 昂之 (UCHIKAI, Takayuki)

亀卦川 樹 (KIKEGAWA, Tatsuki)

北田 洋平 (KITADA, Yohei)