

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 23 日現在

機関番号：74408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830142

研究課題名(和文) 生物情報学的な予測に基づくカタユレイボヤにおけるペプチド性因子の受容体解明

研究課題名(英文) Identification of Ciona specific peptides' receptors using machine learning-based prediction

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リガンドとなる低分子化合物を同定した際の受容体探索はその分子の機能解析における重要な課題の一つである。しかし、無脊椎動物に独自の配列を持つペプチドリガンドの受容体予測はこれまで困難であった。そこで、真に相互作用に寄与する特徴を抽出・学習する機械学習法を開発し、これまで我々が検出してきたカタユレイボヤの受容体未知ペプチドの受容体を予測・検証した。その結果、ホヤ独自のペプチドの新規受容体を複数同定することに成功した。その中には、既知ペプチド受容体と相同性を示さない受容体も含まれていたことから本手法は単純な配列相同性ではリガンドを推定できない受容体についても予測可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Genomic and peptidomic analyses have identified huge amount of peptide hormones. However, due to the throughput of their receptors screening, the functions for most of these hormones have yet to be elucidated. Here, we developed the machine learning based-prediction model including selection of features plausibly attributed to peptide-receptor interactions. To verify this prediction model, we predicted the receptors for orphan neuropeptides of *Ciona intestinalis* and assessed its activity. The prediction and assays for the four orphan neuropeptides newly identified their receptors. Moreover, some of these receptors were far from known peptide receptors, indicating the prediction model availability for wide range of peptides and receptors.

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 GPCR ペプチド カタユレイボヤ ホヤ 相互作用 予測

1. 研究開始当初の背景

網羅的解析手法の発達により、多種多様な生物に関する膨大なゲノム/タンパク質配列情報が蓄積されてきたが、これらの解析結果は分子の存在を明らかにするに留まり、その分子の機能を明らかにすることはできない。本研究に用いるカタコウレイボヤに関して例外ではなく、ゲノム配列の決定、神経ペプチドやペプチドホルモンの網羅的同定がなされているにも関わらず、ペプチドのターゲット受容体の同定を古典的な手法に頼らざるを得ないため、同定された分子の殆どは機能未知のままである。

2. 研究の目的

ホヤにおいてリガンド-受容体相互作用予測法の開発、実験検証を行うことで体系的にターゲットを同定する。開発する手法は本研究で用いるホヤのみならず全ての動物でこれまでの逆薬理学的なアプローチの劇的な効率化が可能であり、多種多様な生物種における機能解析を顕著に促進することが期待できる。

3. 研究の方法

ホヤの神経系で発見された受容体の未同定なペプチド約 25 種類の受容体を以下の ~ の手法を用いて同定する。受容体の予測にはこれまで申請者が開発・ヒトにおける実用性を実証してきた統計的予測器に対して、ペプチドへの特化・非哺乳類受容体への一般化を目的とした拡張を行うことでヒトでの検証例同様、30%割程度の Hit 率を達成し、ペプチドの受容体を体系的かつ効率的に探索する。

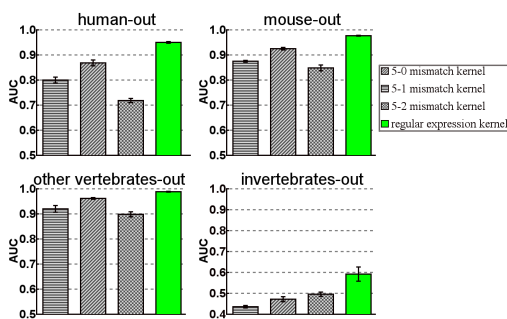
統計的予測器の構築

遺伝的アルゴリズムを組み込んだ新規相互作用予測器の構築

ホヤにおけるペプチドの受容体予測アッセイによる活性評価

4. 研究成果

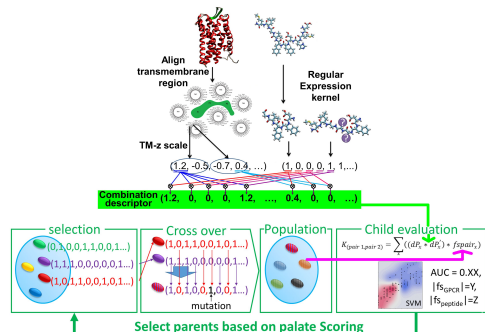
統計的予測器の構築



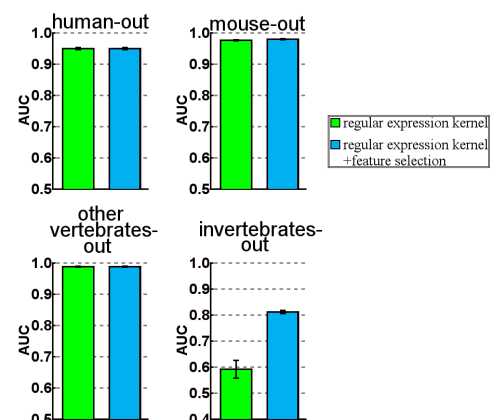
これまでにペプチドやタンパク質を機械学習の入力とするのに最も良く用いら

れてきたミスマッチカーネル(図, 5-0 mismatch, 5-1 mismatch, 5-2 mismatch)及び、Profeat のカテゴリに合わせた5文字の正規表現に対してマッチする配列の有無で表現したカーネル(図, regexp)で予測器を構築した。予測器の構築は先行研究[Shiraishi et. al. 2013]に合わせてGPCRをTM-z scaleで数値列に変換し、それぞれのペプチドの数値表現と組み合わせるSVM(機械学習の一種, Support Vector Machine)への入力とし、予測を行った。予測精度の評価では、学習データからそれぞれ、ヒト・マウス・その他脊椎動物・無脊椎動物の相互作用情報を除いたデータで予測器を構築した場合に除いたデータを予測した場合の予測精度(AUC)を指標にした。どのペプチド記述子を用いた場合も同様に無脊椎動物のデータの予測が困難であることが判明したが、最も精度の高かった regexp カーネルを遺伝的アルゴリズムを組み込んだ予測器の入力とした。

遺伝的アルゴリズムを組み込んだ新規相互作用予測器の構築



で構築した予測器では、全ての数値列成分を機械学習への入力としていたが、本段階で予測精度が高くなるような数値列成分のみの組合せで予測を行うよう、遺伝的アルゴリズムを用いて数値列の組合せの最適化を行った。その結果、これまでの他の手法ではAUCが0.6以下と予測精度が悪かった無脊椎動物の予測で劇的に予測精度を向上させる(AUC>0.8)数値列成分の組合せを得ることが出来た。(下図)



ホヤにおけるペプチドの受容体予測

得られた予測器を用い、カタユウレイボヤ(ホヤ)においてこれまでに受容体の決まっていないペプチド(Orphan peptide)の受容体を予測した。既に受容体の決定されているペプチドの相互作用予測結果についても下図の右上に追記している。予測の結果、ci-GALP, ciNtLP2, ci-LF2, ci-YFV-1 でそれぞれと特異的に相互作用すると予測される受容体(GPCR)が得られたため(下図の赤で示されたマスの縦列(受容体)と横行(ペプチド)の組合せが相互作用すると予測されたペア)それらの組合せが活性を有するのかの検証に用いた。

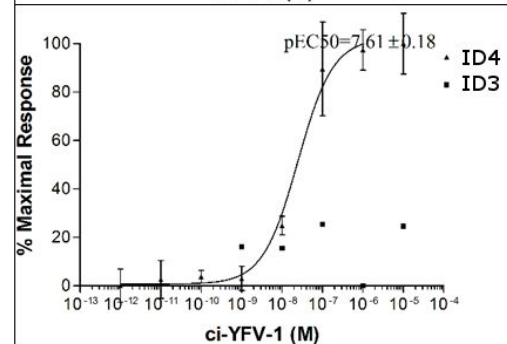
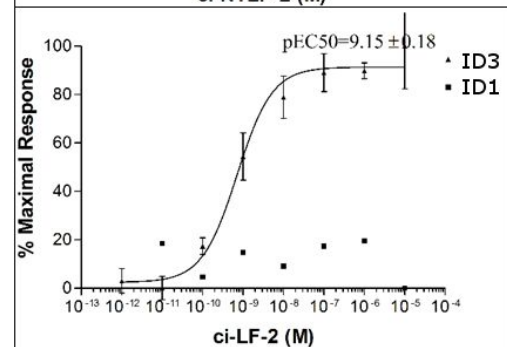
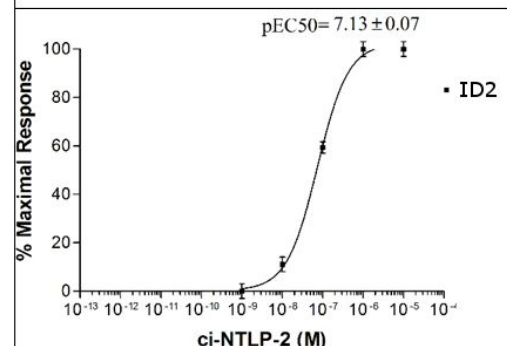
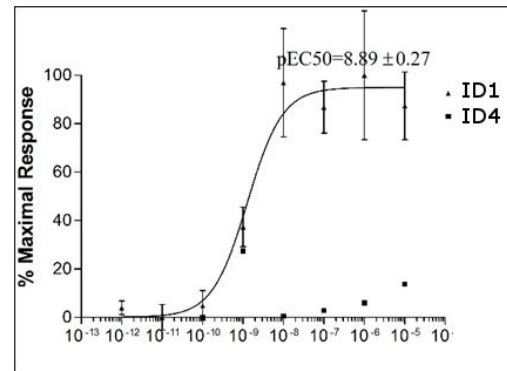
Orphan GPCRs	Ligand -identified GPCRs	Receptor-identified peptides										Orphan peptides							
		CI-TK-1	Cloinin	t-GNRH-3f	GNRH-5f	GNRH-6	ci-galp	ci-NtLP-2	ci-LF-2	ci-YFV-1	HVRHFYGLMa	NYYGWDFa	PHWSKGYSPGa	PHWSYERMPGa	PHWSYEVMPGa	PFRGGGGWILNSVIGVYVNLGALRKLFE	MMLGPGIL	YPGFQGLF	ELWVRDPYFV
KHL7.11.v1.A.SLI-1	91.6%	7.4%	13.4%	17.0%	23.9%	19.8%	1.3%	10.5%	2.4%	1.5%	7.4%	83.4%	9.0%	18.9%	9.0%	5.6%	25.9%	19.7%	18.1%
KH.C2.865.v1.A.NDI-1	7.4%	83.4%	9.0%	18.9%	9.0%	5.6%	25.9%	19.7%	18.1%	18.8%	7.5%	80.6%	44.3%	21.2%	13.3%	7.0%	2.3%	10.0%	1.2%
KH.C14.565.v1.B.NDI-1	8.4%	80.6%	44.3%	21.2%	13.3%	7.0%	2.3%	10.0%	1.2%	1.2%	7.5%	24.2%	22.2%	98.2%	76.8%	78.4%	93.5%	93.5%	93.5%
KH.C3.281.v1.C.SLI-1	7.5%	24.2%	98.2%	76.8%	78.4%	93.5%	93.5%	93.5%	93.5%	93.5%	6.5%	6.5%	22.2%	98.2%	76.8%	78.4%	93.5%	93.5%	93.5%
KH.C3.705.v1.A.SLI-1	6.5%	22.2%	98.2%	76.8%	78.4%	93.5%	93.5%	93.5%	93.5%	93.5%	20.2%	11.4%	6.4%	0.6%	0.6%	0.6%	0.6%	0.6%	0.6%
KH.C3.616.v1.A.NDI-1	7.2%	19.4%	99.6%	81.9%	95%	20.2%	11.4%	6.4%	0.6%	0.6%	3.3%	31.1%	6.5%	9.4%	9.4%	9.4%	9.4%	9.4%	9.4%
ID1	3.3%	19.5%	42.5%	6.4%	2.6%	81.5%	31.1%	6.5%	9.4%	9.4%	3.3%	31.1%	6.5%	9.4%	9.4%	9.4%	9.4%	9.4%	9.4%
ID2	5.2%	21.1%	19.5%	11.8%	5.8%	23.3%	8.3%	10.0%	3.1%	12.7%	13.4%	21.1%	19.5%	11.8%	5.8%	23.3%	8.3%	10.0%	3.1%
ID5	13.4%	28.0%	24.3%	36.5%	34.9%	28.4%	93.2%	3.1%	12.7%	12.7%	4.3%	22.8%	22.8%	22.8%	22.8%	22.8%	22.8%	22.8%	22.8%
ID3	4.3%	22.8%	45.3%	18.1%	10.9%	0.5%	6.3%	82.3%	1.3%	1.3%	8.1%	8.1%	8.1%	8.1%	8.1%	8.1%	8.1%	8.1%	8.1%
ID6	8.1%	24.4%	6.4%	11.4%	5.5%	26.2%	26.2%	26.2%	26.2%	26.2%	15.9%	15.9%	15.9%	15.9%	15.9%	15.9%	15.9%	15.9%	15.9%
ID7	15.9%	20.6%	41.0%	26.7%	27.1%	3.5%	4.0%	64.0%	2.2%	2.2%	27.8%	27.8%	27.8%	27.8%	27.8%	27.8%	27.8%	27.8%	27.8%
ID4	27.8%	19.9%	32.2%	30.0%	30.0%	18.3%	14.3%	4.4%	71.2%	71.2%	19.9%	19.9%	19.9%	19.9%	19.9%	19.9%	19.9%	19.9%	19.9%

アッセイによる活性評価

各ペプチドと相互作用すると予測された受容体と、その受容体が活性化した場合に細胞内カルシウムを上昇させるためのG_q16を融合したキメラタンパクを昆虫細胞Sf-9に発現させ、各ペプチドを添加した場合の細胞内カルシウム濃度の変化

を fluo-8 による蛍光で検出した。その結果、ID1-4 の受容体がそれぞれ各ペプチドを添加した場合に特異的かつ濃度依存的に細胞内カルシウム濃度を上昇させることが分かった。以上の結果より、新規相互作用予測器により、ci-GALP, ciNtLP2, ci-LF2, ci-YFV-1 の受容体を新規に予測・同定することが出来たことが示された。さらに、ID2, 3 は既知ペプチド受容体と相同性を示さない受容体であったことから本手法は単純な配列相同性ではリガンドを推定できない受容体についても予測可能であることが示唆された。

現在、本成果について学術論文を投稿中である。



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 4件)

Toshio Sekiguchi, Akira Shiraishi, Honoo Satake, Kenji Kuwasako, Hiroki Takahashi, Masayuki Sato, Makoto Urata, Shuichi Wada, Masato Endo, Takahiro Ikari, Atsuhiko Hattori, Ajai K Srivastav, Nobuo Suzuki "Calcitonin-typical suppression of osteoclastic activity by amphioxus calcitonin superfamily peptides and insights into the evolutionary conservation and diversity of their structures" General and Comparative Endocrinology Volume 246, 15 May 2017, Pages 294-300

T Kawada, A Shiraishi, M Aoyama, H Satake "Transcriptomes of the Premature and Mature Ovaries of an Ascidian, *Ciona intestinalis*" Front Endocrinol (Lausanne). 2017; 8: 88.

A Shiraishi, J Murata, E Matsumoto, S Matsubara, E Ono, H Satake "De Novo Transcriptomes of *Forsythia koreana* Using a Novel Assembly Method: Insight into Tissue-and Species-Specific Expression of Lignan Biosynthesis-Related Gene" PloS one 11 (10), e0164805

Shin Matsubara, Tsuyoshi Kawada, Tsubasa Sakai, Masato Aoyama, Tomohiro Osugi, Akira Shiraishi, Honoo Satake "The significance of *Ciona intestinalis* as a stem organism in integrative studies of functional evolution of the chordate endocrine, neuroendocrine, and nervous systems" General and comparative endocrinology 227, 101-108

[学会発表](計 1件)

白石 慧、佐竹 炎 「GPCR に普遍的な相互作用パターン抽出による生物種ワイドな相互作用予測法の開発」第36回日本分子生物学会年会 12.3-6(神戸)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(3) 連携研究者

奥野 恭史 (OKUNO Yasushi)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20283666

佐竹 炎 (SATAKE Honoo)
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・主幹研究員
研究者番号：20280688

(4) 研究協力者

奥田 利美 (OKUDA Toshimi)
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・協力研究員