

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700318

研究課題名（和文） 分子進化的観点に基づいた天然変性タンパク質の解析及び分類法の開発

研究課題名（英文） Analysis of intrinsically disordered proteins based on molecular evolution

研究代表者

廣瀬 修一（HIROSE SHUICHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター・協力研究員

研究者番号：60549898

研究成果の概要（和文）：天然変性タンパク質の特徴を見出すこと、及びこれらの分類法を開発することを目的とし、既知天然変性タンパク質群を対象として情報学的な解析を行った。その結果、「オーソログ配列分布」および「天然変性領域割合の変化」の2種類の特徴を見出し、これらに基づき、天然変性タンパク質が分類可能であることが示唆された。また、分子進化に伴う天然変性状態の獲得がタンパク質機能獲得と関連しているという新規な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In order to find out distinctive features of intrinsically disordered proteins and means for classification of them, we conducted the bioinformatics analysis based on molecular evolution. As a result, two features, which are “ortholog distribution pattern in phylogenetic tree” and “change of disordered region proportion”, were identified as features. Additionally, it was indicated that intrinsically disordered proteins can be classified based on the two features. Moreover, new knowledge concerning relationship between increase in disordered region and protein function acquisition was obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、進化生物学

キーワード：分子進化、遺伝子進化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 一般的に、タンパク質は安定な立体構造を形成することにより、その生物学的な機能を発揮すると考えられてきた。これに反し近年、生理条件下で特定の立体構造が欠如している天然変性タンパク質/領域（ディスオーダータンパク質/領域）が存在し、特に真核生物に多数存在することが報告されてきてい

る。また、天然変性タンパク質は、立体構造が欠如しているにもかかわらず、生物学的機能を有することも報告されていた。

(2) 天然変性タンパク質は、安定な立体構造を有するタンパク質（以下「構造タンパク質」と呼ぶ）とは異なった固有の特徴を有してい

る。例えば、天然変性タンパク質に見られるアミノ酸出現頻度は、構造タンパク質とは異なっており、荷電性アミノ酸が多く、疎水性アミノ酸が少ないことが報告されていた。

(3)天然変性タンパク質は、機能ドメインレベルでは配列保存性が見られることが報告されているが、配列保存性については、それほど多くの議論がなされていなかった。また、分子進化的な観点から、天然変性タンパク質の保存性を解析した例は存在していなかった。

(4)現在、構造タンパク質は、CATH や SCOP に代表される種々の立体構造分類データベースが存在している。一方、天然変性タンパク質を体系的に分類する方法、及び分類データベースは存在していなかった。

## 2. 研究の目的

(1)天然変性タンパク質に存在する固有の特徴を見出すことを目的とする。これまで、背景(2)にあるように、配列情報から天然変性タンパク質の特徴付けがなされている。これに対し、分子進化的観点に注目して天然変性タンパク質の特徴を見出すことが本研究の特徴である。

(2)目的(1)から見出された特徴に基づき、天然変性タンパク質の分類が可能であるかを検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)本研究では、分子進化的観点から解析を行うため、SSU-rRNA に基づく進化系統樹を基準にして天然変性タンパク質を解析した。図1に解析の流れを示した。以下、各工程について詳細を記述する。

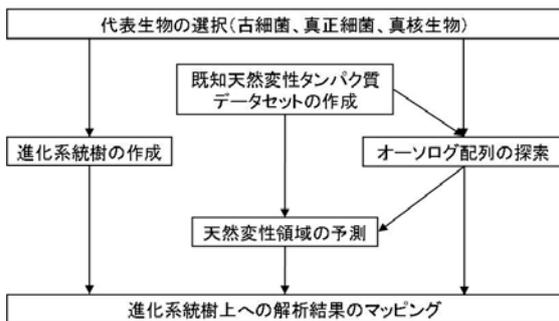


図1. 解析の流れ。

(2) 2種類のデータセットを準備した。

### ①ゲノムデータセット

ゲノム配列が決定されている生物群から、解析に用いる代表生物 65 種を選定した。内訳は、古細菌 12 種、真正細菌 16 種、真核生物 37 種である。代表生物のゲノム配列は、NCBI の RefSeq からダウンロードした。このデータセットは、進化系統樹作成とオーソログ配列探索に利用する。

### ②天然変性タンパク質データセット

天然変性タンパク質は、天然変性タンパク質データベースである DisProt

(<http://www.disprot.org/>) version 5.7 からアンフォールドタンパク質 (天然変性領域割合が 80%以上のタンパク質) を収集した。その後、配列間の重複度が 25%以上の配列を取り除いた。最終的に、66 配列の天然変性タンパク質が得られた。これらの各配列に対して、進化系統樹に基づいた解析を行った。

(3) Woese らの手法 (Woese CR. *et al.*, 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4576-4579) に従い、代表生物 65 種の SSU-rRNA 配列を利用し、近隣接合法を用いて進化系統樹を作成した。

(4)天然変性タンパク質 66 配列の各配列に対して、全 65 生物種でオーソログ配列を探索した。BBH (Bidirectional Best Hit) 法に基づき、BLAST 検索結果で E-value が  $1e^{-5}$  よりも小さい値を持つ配列が存在する場合、オーソログ配列が存在すると判定した。基準値より E-value が大きい配列に関しては、目視によりオーソログ配列かどうかの確認を行った。

(5) 3種類の天然変性領域予測法 (POODLE-L、DisProt、IUPred) を用いて、天然変性タンパク質 66 配列、及びそれらのオーソログ配列の天然変性領域を予測した。これらの天然変性領域予測法は、アミノ酸配列のみを入力とし、各アミノ酸が天然変性状態であるかどうかを予測するものである。天然変性領域割合は、配列長に対する天然変性状態の残基数として計算した。

(6)天然変性タンパク質 66 配列の各配列に対して、方法(3)の進化系統樹上に、方法(4)のオーソログ配列の有無、及び方法(5)の天然変性領域の割合の 2 種類の情報をプロットした (図 2)。その後、系統樹上でのオーソロ

グ配列の分布と、天然変性領域割合の変化を調査した。

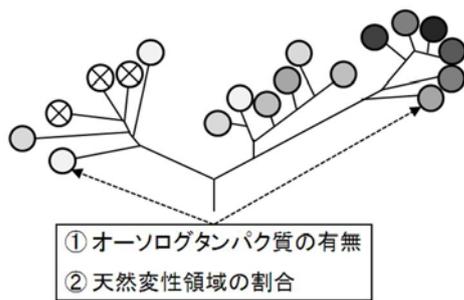


図2. 進化系統樹への解析データマッピングのイメージ図。枝先の円に“X”が表示される場合、その生物に天然変性タンパク質のオーソログ配列が存在しないことを示す。一方、円に色がついている場合は、オーソログ配列が存在することを示し、その色が濃いほど天然変性領域の割合が高いことを示す。

#### 4. 研究成果

(1)「オーソログ配列分布」と「分子進化に伴う天然変性領域割合の変化」が天然変性タンパク質の特徴づけに利用できるか、そしてこれらの情報に基づいて天然変性タンパク質の分類が可能であるかを検討した。

##### ①オーソログ配列分布について

天然変性タンパク質のオーソログ配列の分布は、大まかに3つのグループに分けることができた(図3)。

1つめのグループは、複数の生物界にまたがってオーソログ配列が分布しているものである。このグループに含まれる天然変性タンパク質は少数であり、多くの天然変性タンパク質は真核生物のみにオーソログ配列が分布していた。2つめのグループは真核生物全体にオーソログ配列が分布しているもの、3つめのグループは高等生物のみにオーソログ配列が分布しているものである。これらの結果より、オーソログ配列の分布は、天然変性タンパク質の特徴づけに利用できると思われる。

また解析結果から、多くの天然変性タンパク質が、真核生物誕生の初期とカンブリア爆発にその起源を持つことが示唆された。

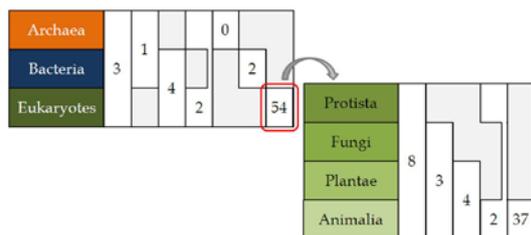


図3. 天然変性タンパク質のオーソログ配列

の分布。数字は、天然変性タンパク質の数を示す。

##### ②天然変性領域割合の変化について

分子進化に伴う天然変性領域割合の変化には、2つのパターンが存在した(図4)。

多くの天然変性タンパク質では天然変性領域割合の変化は観測されなかったが、いくつかの天然変性タンパク質では分子進化に伴った天然変性領域割合の変化が見られた。天然変性領域予測には3種類の予測法を適用したが、どの予測法を用いた場合でも、同様の結果を得ることができた。

これらの結果より、天然変性領域割合の変化は、天然変性タンパク質の特徴づけに利用できると思われる。

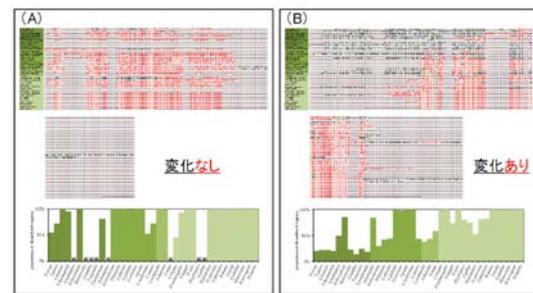


図4. (A)protein phosphatase 1 regulatory subunit 11、(B)Synaptobrevin-2 の分子進化に伴う天然変性領域変化の解析例。いずれもオーソログ配列が真核生物のみに分布しているタンパク質である。アラインメント(上)において、赤字部分が POODLE-L で天然変性状態と予測された領域である。棒グラフ(下)では、各生物のオーソログ配列中の天然変性領域の割合を示している。

##### ③天然変性タンパク質の分類について

「オーソログ配列分布」と「天然変性領域割合の変化」を指標として、天然変性タンパク質66配列の分類を試みた(図5)。

複数の生物界にオーソログ配列が分布している配列群では、天然変性領域割合が変化していなかった。このグループにはリボソームタンパク質が多く含まれていた。これらの生物学的機能は概ね生物全体に共通するため、分子進化においても変異が起きにくいと考えられる。従って、天然変性領域割合も変化しにくいのではないかと推測される。

真核生物や高等生物のみにオーソログ配列が分布するグループでは、天然変性領域割合が変化しない配列群と変化する配列群の2種類が存在した。天然変性領域割合が変化したものは、そのタンパク質機能が変化したのではないかと推測される。詳しくは、研究成果(2)で議論する。

以上の結果から、2つの指標を用いることにより、天然変性タンパク質を5つのグループに分類することが可能であることが示唆さ

れた。

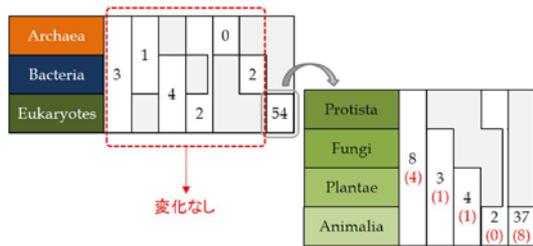


図 5. 分子進化に伴う天然変性領域割合の変化が見られたタンパク質の数。カッコ内の数字は、天然変性領域割合が変化したタンパク質数を示す。

(2) 分子進化に伴い天然変性領域割合に変化が見られたタンパク質に対して、天然変性状態への変化とタンパク質機能との関連性について調査した。

図 6 に Synaptobrevin-2 の解析例を示した。このタンパク質は、Syntacix-1A と SNAP-25 と相互作用し、神経伝達物質の放出に参与している。図中のアラインメントは相互作用部位周辺を示している。この領域は、真核生物の初期の段階では立体構造を形成していた（オーダ領域）が、高等生物に近づくにつれて天然変性状態に変化していた。この変化と、Synaptobrevin-2 の機能が高等生物に特異的な機能であることを考慮すると、天然変性状態の獲得がタンパク質の新規機能獲得につながったと推測される。これは、天然変性状態獲得とタンパク質機能との関連性を示した新規な知見である。

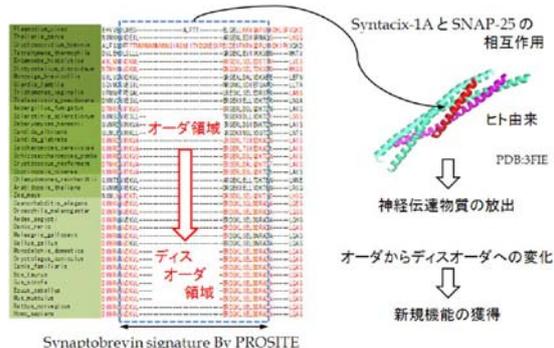


図 6. Synaptobrevin-2 に見られた天然変性状態への変化。アラインメント（左）の赤字の部分、POODLE-L で天然変性状態と予測された領域を示す。

(3) 本研究の成果として得られた天然変性タンパク質 66 配列に対する解析データを公開することを目的として、web システムの構築を行った。天然変性タンパク質データセット、代表生物

データセット、オーソログ配列、天然変性領域予測結果等の情報を MySQL を用いて、データベース化した。次に、Perl、PHP、及び Apache を用いて web サーバを構築し、クライアントマシンのブラウザから、データベースに格納されているデータを閲覧できるシステムを開発した。Web 上からは、解析データをマッピングした進化系統樹、オーソログ配列のマルチプルアラインメント、天然変性領域、及び配列情報などを閲覧することができる（図 7）。

現在構築したシステムは公開できていないが、近いうちにデータの公開を予定している。

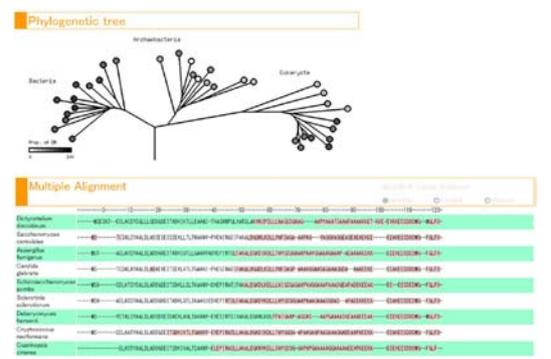


図 7. 進化系統樹へオーソログ配列分布と天然変性領域割合変化をマッピングした画面（上）、及びオーソログ配列のアラインメントとその天然変性領域を表示した画面（下）。

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）

- [学会発表] (計 2 件)
- ① 廣瀬修一、花輪孟、松山泰男、野口保、Analysis of intrinsically disordered proteins based on molecular evolution、CBI/JSBi 2011 合同大会、2011 年 11 月 8 日、神戸
- ② 廣瀬修一、花輪孟、野口保、分子進化的観点から見た天然変性タンパク質の解析、第 11 回日本蛋白質科学会年会、2011 年 6 月 6 日、大阪

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
廣瀬 修一 (HIROSE SHUICHI)  
独立行政法人産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター・協力研究員  
研究者番号：60549898