

ゲノム配列データからファミリーを効率よく検索するシステム開発のための基盤研究

●山縣 ゆり子

大阪大学大学院薬学研究科（現熊本大学大学院医学薬学研究部）

〈研究の目的と進め方〉

ゲノム配列に書き込まれている未知蛋白質のアミノ酸配列から機能を解明することは、ポストゲノム計画の最重要課題である。3D-1D法はアミノ酸配列から立体構造を予測する最も有効な方法であるが、まだ予測確率は不十分である。3D-1D法の方法論はほぼ確立しているので、予測確率向上のためには、構造と配列の適応を評価する評価関数を精度の高いものとする必要がある。本研究は、我々が求めた立体構造安定性パラメータを考慮し、より高精度の評価関数（3D-1D法では3Dプロファイルのパラメータ）を考案し、ある基本立体構造（ファミリー）をとり得るアミノ酸配列を効率よく探す方法を開発することを目的とした。

開発する予測法の評価は、我々が見いだしたアミノ酸配列の相同性の低いDNAグリコシラーゼスーパーファミリーのメンバーを効率よく検索できるか否かで行うこととした。

〈研究開始時の研究計画〉

1) 本スーパーファミリー専用3Dプロファイルは、立体構造が明らかになっている2つのグリコシラーゼの構造をもとに、メンバーのアミノ酸配列のアライメントを行ない、特に挿入、削除の多い領域を除いたコア共通構造を抽出、Eisenbergらの方法を応用して3Dプロファイルを作成し、それぞれのパラメータを我々が定量化した水素結合の安定性パラメータを考慮し補正する。さらに、3Dプロファイルのパラメータへの疎水性相互作用等他の安定性パラメータの組み込み方、ファミリーの構造の抽出の仕方等を、既存の3D-1D法では予測できない2つのDNAグリコシラーゼの立体構造類似性予測を指標にして最適化する。最適化された本スーパーファミリー専用3Dプロファイルを用いて次々と解析されるゲノムから推定される蛋白質のアミノ酸配列データベースからスーパーファミリーのメンバーの候補となるアミノ酸配列を抽出する。

2) 現在までに明らかになっているもの、あらたに見つかったものを含め、代表的各ファミリーのメンバーの立体構造、活性部位のモデルをホモロジーモデリングの要領で作成、活性部位に認識されやすい損傷塩基を確認すると共に、新メンバーについては未知の基質を予測する。

〈研究期間の成果〉

Eisenbergらの方法で作成した3Dプロファイルと比較し、我々が定量化した水素結合の安定性パラメータを考慮し補正すると予測確率は上昇した。ファミリー構造の抽出の仕方を工夫すると、さらに予測確率は上昇した。さらに、我々が新たに求めた塩橋〔論文1〕や分子内部の極性残基〔論文3〕の効果を考慮することや蛋白質の安定性に大きく影響する疎水性相互作用の効果〔論文2他〕についての考慮の仕方についても検討した。塩橋を考慮すると予測確率はさらに上昇し、既存の3D-1D法で予測できない2つのDNAグリコシラーゼの立体構造類

似性予測がある程度可能になったと言える。

研究期間内に最適化された3Dプロファイルを用いた3D-1D法で見出されたシアノバクテリアのAlkAホモログORF（slr0231）は本スーパーファミリーのメンバーで最小のアミノ酸残基からなる。通常200残基以上であるが、slr0231は約150残基である。これがグリコシラーゼ活性をもつとスーパーファミリーの最小立体構造が変わる。そこでslr0231をクローニングし、BL21（DE3）中で発現させ蛋白質を調製したが、フォールドしないので機能する蛋白質（正しいORF）でないかもしれないことが示唆された。

〈国内外での成果の位置づけ〉

我々が行ってきた安定性に影響する因子の寄与の定量化が、立体構造予測に貢献できることを示したものと思う。

〈今後の課題〉

DNAグリコシラーゼスーパーファミリー検索に関する比較的よい3Dプロファイルが出来たので、同様の方法で他のファミリーの検索にもある程度対応できるか検討する必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

論文

1) 0202112122

Contribution of Salt Bridges near the Surface of a Protein to the Conformational Stability

Kazufumi Takano, Kimiko Tsuchimori, Yuriko Yamagata and Katsuhide Yutani

Biochemistry, 39, 12375-12381 (2000)

2) 0202112126

Role of Surface Hydrophobic Residues in the Conformational Stability of Human Lysozyme at Three Different Positions

Jun Funahashi, Kazufumi Takano, Yuriko Yamagata and Katsuhide Yutani

Biochemistry, 39, 14448-14456 (2000)

3) 0202112136

Contribution of Polar Groups in the Interior of a Protein to the Conformational Stability

Kazufumi Takano, Yuriko Yamagata, and Katsuhide Yutani

Biochemistry, 40, 4853-4858 (2001)