2P309

アミノ末端の物理化学的性質解析によるミトコンドリアタンパク質予測システムの構築

○辻 敏之^{1,2}、美宅 成樹¹ (¹ 名大院・工・マテリアル理工、² 名大・21世紀COEプログラム・計算科学フロンティア)

多くのミトコンドリアに局在するタンパク質は、ゲノムDNAにコードされており、細胞質で合成されたのちにミトコンドリアへ移行する。この局在化イベントは細胞質中の移行装置がミトコンドリアタンパク質アミノ末端などにあるミトコンドリア局在化シグナルを認識していると考えられている。我々はまず始めに、ミトコンドリア局在タンパク質と細胞質のタンパク質のアミノ末端における物理化学的性質についてアミノ酸配列解析を行った。その結果、ミトコンドリアタンパク質と細胞質タンパク質のアミノ末端は、正電荷残基が豊富であること、若干の疎水性を持つこと、芳香族アミノ酸を好むこと、プロリン・グリシン残基を好まない傾向があることが明らかになった。この結果をもとに、上に挙げた4つの性質について各データセットの全タンパク質についてアミノ末端の物理化学的性質をより詳細に調べた。タンパク質のアミノ末端を負電荷残基のクラスタまでと定義し、そこまでの物理化学的性質の各データセット内平均値を求め、ミトコンドリアタンパク質および細胞質タンパク質の性質を比較することで予測を行ない、約85%の精度でミトコンドリアタンパク質を予測することに成功した。これに加えて、ミトコンドリアタンパク質では総電荷の移動平均を20残基以上という広めのウィンドウで見たときに、値が正から負へと転換する傾向が強いこと、そのとき細胞質タンパク質に比べて切り替わる点のアミノ末端からより離れていることが明らかになった。この性質を踏まえ、これまで用いていた負電荷クラスタまでをアミノ末端とする定義を総電荷移動平均の正から負への転換点とした場合に、ミトコンドリアタンパク質のアミノ末端における物理化学的性質がどのような特徴を持っているかを調べる。またそれを用いた予測システムを構築し、これらについて発表する。

T.Tsujii, S.Mitaku : Software system for the prediction of mitochondria localization on the basis of physicochemical profiles in amino terminal segments

2P311

βバレル型膜タンパク質におけるアミノ酸配列解析

○井野 綾乃¹、辻 敏之^{1,2}、朝川 直行¹、今井 賢一郎¹、園山 正史^{1,2}、美宅 成樹¹ (¹ 名大院・工・マテリアル理工、² 名大・21世紀COEプログラム・計算科学フロンティア)

グラム陰性菌やミトコンドリア・葉緑体の外膜にはβバレル型の膜タンパク質があるが、それらは外膜に存在する膜組み込み装置 (SAM) によって形成されている。βバレル型膜タンパク質はαタイプのもものと異なり、全体として親水性が高いにもかかわらず非極性の膜内に組み込まれることから、形成メカニズムには組み込み装置によるアミノ酸配列の分子認識が本質的だと考えられている。今回の発表では構造が比較的良く知られているグラム陰性菌のβバレル型膜タンパク質に焦点を絞った。これまでに分かっている特徴として、次の三点があげられる。1) グラム陰性菌の外膜に外側に向けて生えている糖鎖と、βバレル型膜タンパク質の芳香族は相互作用している。2) 膜貫通領域において、親水性の残基をもつアミノ酸と疎水性の残基をもつアミノ酸とが互い違いに存在し、親水性の残基はバレルの内側に、疎水性の残基を外側に向けている。3) 貫通領域を結ぶループについて、外膜の内側にあるものは極端に短く、外側にあるものは長いという傾向がある。これらの事実と、辻らが開発したアミノ酸配列物性解析システム (SOSUIseq) を用いて、βバレル型膜タンパク質と水溶性タンパク質のアミノ酸配列の様々な物性分布を比較した結果得られた推定をもとに、組み込み装置が行っている分子認識について考察した。

その結果、βバレルを構成する膜貫通ストランドは短いループ部位にマイナス電荷をもつことが多く、また短いループを中心に、電荷と芳香族が特徴的なシンメトリを形成していることがわかった。また、ストランド領域は二残基周期性が非常に高い。これらの特徴的な物性は分子認識装置を介したβバレル型膜タンパク質の構造形成へ示唆を与える。また、この結果を用いてアミノ酸配列からのβバレル型膜タンパク質予測を行う予定である。

A.Ino, T.Tsujii, N.Asakawa, K.Imai, M.Sonoyama, S.Mitaku : Amino acid sequence analysis of beta-barrel transmembrane proteins

2P310

物理化学的性質に注目したアレルゲンタンパク質のエピトープ候補解析

○朝川 直行¹、手島 玲子²、美宅 成樹¹ (¹ 名大院・工・マテリアル理工、² 国立衛研)

アレルギーの発症はアレルゲンが複数のIgE抗体に認識・結合されることが引き金となる。IgE抗体が結合するサイトはIgEエピトープと呼ばれており、アレルゲンの研究や治療法の開発にはIgEエピトープの同定が重要である。しかし多くのアレルゲンについてそのエピトープ領域は未知であり、高精度な予測が望まれている。既存の予測法としては既知アレルゲンとの相同性検索や6~8残基以上の配列の一致 (FAO/WHO, 2003)、既知アレルゲンから抽出したモチーフ検索 (Stadler, 2003) などがあるが、これらは配列の部分的な相同性を利用した手法であり、過剰予測や未知配列の予測ができないといった問題がある。

そこで本研究では、IgEエピトープ周辺の物理化学的な性質に注目することで、アレルゲンの構造やIgE抗体との分子認識のファクタの抽出を目指し、高精度な予測を行うことを提案した。

まずIgEエピトープ未知のアレルゲンからエピトープ候補領域を抽出するため、以下の2段階の過程によって候補を抽出した。1. アレルゲンと非アレルゲンのデータセットをそれぞれ用意し、1つのタンパク質に複数回出現する3~8残基の断片配列を抽出した。2. 抽出した断片配列を組み合わせ、アレルゲンデータセットのみに出現する断片のペアを探索した。この候補抽出によって既知エピトープ57領域のうち53領域を捉えることができ、また663のアレルゲンのうち629に候補領域が存在した。しかしこの手法ではヒトゲノムなどにも多くの候補領域が存在していた。この断片配列による候補領域からエピトープ領域を絞り込むため、候補領域周辺のアミノ酸配列の物理化学的な性質をプロファイル化したところ、電荷や芳香族、またCys, Pro, Glyといった構造に関わるアミノ酸について特徴的な分布がみられた。

N.Asakawa, R.Teshima and S.Mitaku : Analysis of physicochemical properties of epitope candidate segments of allergen proteins

2P312

局所1分子表面増強共鳴ラマン散乱法

○渡辺 香織¹、角田 誠¹、上野 太郎¹、山岸 舞¹、船津 高志^{1,2} (¹ 東大院薬、² JST CREST)

生体1分子観察法は生体分子の機能解析に大きく貢献している。蛍光を使った1分子蛍光イメージング法や1分子FRETが代表として挙げられ、分子間相互作用や構造変化を1分子レベルで観察できるようになった。しかし、分子間相互作用に伴う構造変化や分子修飾を同時に観察することは現行法では困難である。それを可能とする手段として、我々はここにラマン散乱光を用いた新たな手法を提示する。ラマン散乱は分子の結合振動エネルギーを表しており、生体分子内の様々な結合をより詳細に測定するのに適している。しかし、その強度は非常に微弱であるため本来1分子観察に適さなかったが、表面増強共鳴ラマン散乱法 (SERRS) を用いることにより、ラマン散乱光を蛍光程度まで増強可能となった (Nie and Emory, 1997)。SERRSによるラマン光の増強は光を吸収する分子にのみ有効である。たんぱく質の場合、光の吸収が280 nm付近にあるが、この波長で励起することは分子にダメージを与えると懸念される。本法ではSERRSを全ての分子に適用可能とするため観察対象分子を光吸収分子、例えばローダミン、で標識し、標識部位近傍のラマン散乱光を観察する。本法実施例として蛍光標識したactinのラマン散乱光を観察した。ラマン散乱スペクトルにはADPのラマン散乱光も微弱ではあるが確認できた。Actinのローダミン吸着部位からADP結合サイトまで約2.5 nmであることからラマン光が増強される範囲は光吸収分子の吸着部位から約2-3 nm以内であることがわかった。今後ラマン散乱光による局所1分子機能解析法による分子間相互作用、構造変化、および分子修飾等の解析が期待される。

K. Watanabe, M. Tsunoda, T. Ueno, M. Yamagishi and T. Funatsu : Localized single molecule surface enhanced resonance raman scattering