

| | | | | | |
|----------|-------------------------------------|-------|----|----|----|
| L1112-14 | 常温菌・好熱菌タンパク質における局所構造及びアミノ酸対組成の統計的解析 | | | | |
| | 氏名 | 木村 俊太 | 主査 | 黒田 | 副査 |

[背景・目的]

タンパク質の熱安定性向上は、タンパク質の産業利用に繋がる重要な課題の一つである。そのため、タンパク質の安定化機構の解明を目指して高温で安定な好熱菌タンパク質と常温菌タンパク質の配列を比較する研究は現在まで盛んに行われてきた。近年の主な解析手法としては「アミノ酸に露出・埋没情報を付加した解析」と「複数アミノ酸残基対を解析単位とした解析」の二つが挙げられる。この二つの方法はそれぞれ有用であるが、両者を組み合わせた解析は未だ行われていない。そこで本研究では両者を組み合わせた新規な解析法を用い、その有用性を検証するとともに、好熱菌タンパク質にて好まれるアミノ酸残基及びアミノ酸残基対を特定することを目的とした。

[研究方法]

データセット構築 代表配列には、PDBに登録されている立体構造から常温菌、好熱菌タンパク質をそれぞれ 3759、1453 配列選出した。次にそれらの各パラメータ（主鎖の二面角、二次構造、溶媒露出表面積、主鎖の水素結合エネルギー）を二次構造計算ソフト DSSP を用いて計算した。この結果から各アミノ酸の露出・埋没を区別した一残基のデータセットと二残基対のデータセットを作成し、各残基の組成差異や二次構造組成を比較する統計的解析を行った。

統計量 アミノ酸組成の差異の指標にはアミノ酸組成の比の対数である LogOdds（下式）を用い、この差異の有意差の統計的検定には母比率の差の検定を用いた。

$$\text{LogOdds}(a) = \ln \frac{\text{Com}_h(a)}{\text{Com}_m(a)}$$

$\text{Com}_h(a)$: 好熱菌タンパク質でのアミノ酸 a のアミノ酸組成
 $\text{Com}_m(a)$: 常温菌タンパク質でのアミノ酸 a のアミノ酸組成

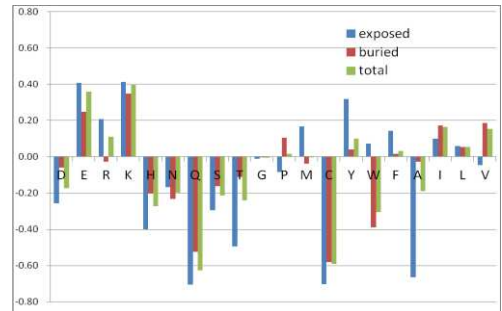


図 各アミノ酸の LogOdds

[結果・考察]

一残基データセットの解析 従来の研究と比較する為に一残基組成の LogOdds を解析した結果、既存の研究どおり D, H, N, Q, S, T, W, A が好熱菌にて有意に減少し、E, K, V が有意に増加していることが示された。さらに A, V の LogOdds は露出・埋没間で大きな差が見られた。しかしどの残基においても二次構造傾向に有意差は見られなかった。

二残基対データセットの解析 次に露出・埋没を区別した二残基対の組成を解析したところ、45 個の二残基対で残基対組成に有意差が見られた。さらに 6 個の二残基対で二次構造傾向に有意差が観測され、4 個の二残基対はそのサンプル数に比して高い LogOdds を示した。これらの局所構造を個別に解析したところ、好熱菌タンパク質のみで外側の β ストランド上を好む T-L 残基対や、常温菌タンパク質でのシートに挟まれた形の逆並行 β シート内に存在している Y-d 残基対など、好熱菌・常温菌タンパク質間で局所構造、特にストランド部位に大きな差異をもつ残基対が観測された。（残基対のアミノ酸表記では露出したアミノ酸を大文字、埋没したアミノ酸を小文字で表記した）

スコアリングによる熱安定性予測 二残基対データセットの全残基対の組成を用いてスコアデータセットを作成し、変異体熱安定性データベース Protherm (Gromiha, 2004) の配列に対して熱安定性変化予測を行った。その結果、二次構造がヘリックス、コイルの二残基対を用いたスコアでは予測効率は低下したが、β ストランドの二残基対を用いたスコアでは予測効率が有意に上昇することが示された。

| | 0GAP | 1GAP | 2GAP | 3GAP | Singlet |
|--------|------|------|------|------|---------|
| ALL | 0.55 | 0.54 | 0.56 | 0.57 | - |
| Helix | 0.53 | 0.54 | 0.57 | 0.53 | 0.54 |
| Strand | 0.64 | 0.74 | 0.69 | 0.70 | 0.48 |
| Coil | 0.56 | 0.57 | 0.51 | 0.49 | 0.57 |

[まとめ]

従来の一残基組成による解析では二種のタンパク質間で二次構造組成に差をもつ残基は特定できなかったが、解析対象を二残基対で行う事でそのような残基対を特定する事が可能となった。また Y-d T-L など二種間で β ストランド部位に特徴的な差異を持つ残基対が観測された事、β ストランド残基対によるスコアによって熱安定性予測の予測効率が上昇した事などから、β ストランド内に配置される残基対の違いが好熱菌・常温菌タンパク質の配列の違いと密に関連している可能性が示唆された。

以上のように、「露出・埋没残基を区別した解析」と「アミノ酸残基対による配列解析」を組み合わせる事は二次構造傾向差を顕著にするという点で有用であり、また同時に β ストランド内の残基対が好熱菌タンパク質と常温菌タンパク質とを隔てる要因ではないかという可能性も示唆した。