

東京大学大学院新領域創成科学研究科
情報生命科学専攻

平成 17 年度

修士論文

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系における
翻訳効率決定要因の配列解析

2006 年 3 月提出
指導教員 高木 利久 教授

46918 藤田 直也

キーワード： 配列解析，無細胞タンパク質合成系，翻訳効率

要旨

ポストゲノム時代と言われる今、タンパク質の立体構造解析や創薬のスクリーニングなど大規模研究において、活性を持ったタンパク質を十分量用意することが必要不可欠になっている。そのための方法として無細胞合成系と呼ばれる *in vitro* のタンパク質合成系が注目されている。中でも、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系では、ハイスループットに転写、翻訳、精製するシステムが構築され、数百種類のタンパク質の大量合成が可能であり、プロテオミクスの基盤技術になることが期待されている。このコムギの系における技術改良の1つに、翻訳に重要である 5'-UTR を翻訳効率の高い配列に統一した点が挙げられる。よって、自動化で反応条件がほぼ等しいことと 5'-UTR が共通であることから、どのようなタンパク質でも合成量が同じぐらいになることが予想される。しかしながら、報告されている合成量には 20 倍以上のばらつきがある。このばらつき程度は実験誤差だけでは説明できず、合成量は各タンパク質に依存して決定されていると考えられる。つまり、合成量に影響を与える因子は、アミノ酸配列とそれをコードする核酸配列の特徴に由来する可能性が高い。そこで本研究では、合成量のばらつきを配列の特徴から説明することができるか試みた。

具体的には、コムギ胚芽無細胞合成系で合成した、シロイヌナズナのタンパク質リン酸化酵素 423 個を対象に、配列に基づく様々な特徴を抽出し、合成量と相関があるかどうかを解析した。その結果、翻訳効率に影響を与える因子が 4 つ同定された。(i) 核酸配列に基づく特徴からは、開始コドン付近の塩基対形成が合成量低下に影響を与えることが示唆された。開始コドンの上流 25nt.~下流 25nt.内での二次構造を予測し、自由エネルギーを求めると、合成量と正の相関が観察された。したがって、その領域で塩基対が多い mRNA は翻訳しにくいことが示唆された。(ii) アミノ酸配列に基づく特徴に関して、アミノ酸インデックスデータベース(AAindex)を使用し、様々な特徴量を調べた。AAindex とは、20 個のアミノ酸を 20 個の数値に変換する指標のデータベースで、現在 516 もの指標が登録されている。解析の結果、油谷らの点変異実験に基づくタンパク質の熱力学的安定性の指標が、合成量に影響を与えることが示唆された。N 末側領域 11aa.~200aa.での熱力学的安定性の指標の総和と、合成量との間には正の相関があった。このことから、熱力学的に安定なタンパク質は合成量が増加し、不安定なものは低下する傾向にあると考えられる。(iii) 他にも、N 末側領域内で disorder 領域の割合が合成量に影響を与えることが観察された。disorder 領域とは特定の構造をとらない領域のことである。N 末側領域 20aa.~206aa.の予測 disorder 残基の割合と合成量には負の相関があった。つまり、N 末側領域がふらふらしているタンパク質は合成量の

低下を招くという示唆が得られた。(ii), (iii)よりタンパク質リン酸化酵素では、N 末側領域の特徴が特に合成量に影響を与えている可能性が考えられる。ドメイン構造からの相対的な位置ではなく、末端からの絶対的な位置であることが興味深い。(iv) さらに別のアミノ酸配列由来の特徴として、**coiled-coil** 構造を持つと予測されたタンパク質は合成量が低下する傾向にあった。また、従来言われている、コドン使用頻度はこのデータセットに関しては影響がないことを確認した。

最後にこれら因子の組み合わせで、合成量の多寡をどの程度説明できるか検証した。4 因子を説明変数、合成量を目的変数として回帰木を構築した。その結果、合成量が低いタンパク質の約半数がこれらの因子で説明可能であった。加えて、合成量が高いタンパク質に関するルールも発見した。翻訳効率の低下に関係する因子群の否定集合となるタンパク質は、合成量が高くなると判別された。

最近、転写因子 661 個の合成量を計測したデータも入手した。リン酸化酵素に対して同定された、塩基対形成に関する傾向はこのデータでも観察されたが、他の 3 因子との相関は見られなかった。あらゆるタンパク質に対して、一般性のある因子の抽出は難しく、タンパク質ファミリーで個別の要因を探索する必要があるのかもしれない。今後、AAindex 由来の安定性以外の指標や、核酸配列由来の他の特徴から、さらなる因子の探索を行う予定である。また、*in silico* で同定した翻訳効率決定因子の有効性を実験的に検証し、無細胞合成系の技術改良に応用していくことを目指す。