近畿大学・農学部・生命情報学

ペアワイズアライメントと配列相同性解析

2008年5月13日（火）

奈良先端大・情報・蛋白質機能予測学講座
川端　猛
takawaba@is.naist.jp
http://isw3.naist.jp/IS/Kawabata-lab/home-ja.html

授業予定

日付	担当	講義	演習
4/8(火)	黒川	バイオインフォマティクス概論	
4/15(火)	黒川	配列解析1	IMCを使ったゲノム解析
4/22(火)	黒川	配列解析2	IMCを使った比較ゲノム解析
5/13(火)	川端	ペアワイズアライメントと配列相同性解析	
5/20(火)	川端	マルチプルアライメントと分子系統学基礎	配列相同性解析と系統樹作成演習
5/27(火)	川端	タンパク質配列の分類と機能推定	
6/3(火)	川端	タンパク質立体構造データの情報解析	タンパク質立体構造データの可視化演習
6/10(火)	川端	<試験>	
6/17(火)	金谷	ポストゲノム解析入門（トランスクリプトーム解析）	
6/24(火)	金谷	ポストゲノム解析入門（インタラクトローム解析）	発現プロファイル解析演習
7/1(火)	金谷	ポストゲノム解析入門（統合解析）	インタラクトローム解析演習・代謝物解析演習
7/8(火)	金谷	メタボローム解析（その1）	
7/15(火)	金谷	メタボローム解析（その2）	
7/22(火)	金谷	<試験>	

これから4回の講義の目標

イネのあるタンパク質のアミノ酸配列があったとして、

イネ：MAALSSAAVTIPSMAPSAPGRRRMRSSLV...

（1）対応するほかの植物（たとえばマメ）のタンパク質を配列データベースから取り出したい

マメ：MATVTSTTBAIPSFSGLKTNAATKVSAMA...

（2）どのアミノ酸とどのアミノ酸が対応するのか？

（3）もっとたくさんの似た配列があった場合、どれとどれが似ているのだろう？

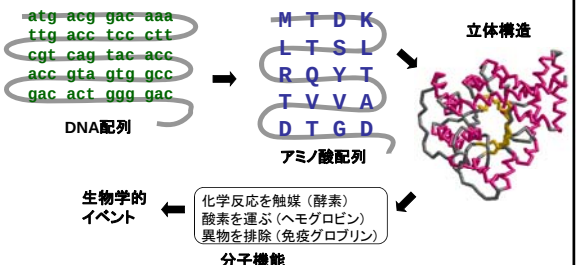
ポプラ：MAALSSAAVSVPSFAAATPMRSSRSSRMV...
ナズナ：MAAITSATVTIPSFTGLKLAVSSKPKTLS...

（4）機能的に大事なアミノ酸はどこだろう？

（5）どんな立体構造をしているのだろう？

ペアワイズアライメント

分子生物学のセントラルドグマ



DNAもタンパク質も所詮、文字が一列に並んだもの(文字列、配列)

atgacggacaaattgacctcccttcgtcagtacaccaccgtagtggcc

M T D K L T S L R Q Y T T V V A D T G D

「進化」とはDNAという文字列が変化すること

atgacggacaaattgacctcccttcgtcagtacacc

M T D K L T S L R Q Y T

atgacgaacaaattgacctcccttcgtcagtacacc

M T N K L T S L R Q Y T

より正確には、個体のDNAが変化したあとに、その変異がその種の集団において定着する「集団遺伝学」的な過程が必要
①個体のDNAに変異が生じる
②その変異が子孫に継承され、
③中立か正の淘汰が働けば、同じ変異を持った子孫が種の集団内で多数を占める

違う生物の同じ機能のタンパク質のアミノ酸配列

トリオースリン酸異性化酵素（Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) (TIM, TPIS)）

```
>TPIS_HUMAN ヒト "Triosephosphate isomerase (EC 5.3
APSRKFFVGGNWKMNGRKQSLGELIGTLNAAKVPADTEVVCAPPT
AYIDFARQKLDPKIAVAAQNCYKVTNGAFTGEISPGMIKDCGATW
VVLGHSERRHVFGESDELIGQKVAHALAEGLGVIACIGEKLDERE
AGITEKVVFEQTKVIADNVKDWSKVVLAYEPVWAIGTGKTATPQQ
AQEVHEKLRGWLKSNVSDAVAQSTRIIYGGSVTGATCKELASQPD
VDGFLVGGASLKPEFVDIINAKQ

>TPIS_RABIT ウサギ "Triosephosphate isomerase (EC 5
APSRKFFVGGNWKMNGRKKNLGELITTLNAAKVPADTEVVCAPPT
AYIDFARQKLDPKIAVAAQNCYKVTNGAFTGEISPGMIKDCGATW
VVLGHSERRHVFGESDELIGQKVAHALSEGLGVIACIGEKLDERE
AGITEKVVFEQTKVIADNVKDWSKVVLAYEPVWAIGTGKTATPQQ
AQEVHEKLRGWLKSNVSDAVAQSTRIIYGGSVTGATCKELASQPD
VDGFLVGGASLKPEFVDIINAKQ
```

違う生物の同じ機能のタンパク質のアミノ酸配列

トリオースリン酸異性化酵素（Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) (TIM, TPIS)）

```
>TPIS_HUMAN ヒト "Triosephosphate isomerase (EC 5.3
APSRKFFVGGNWKMNGRKQSLGELIGTLNAAKVPADTEVVCAPPT
AYIDFARQKLDPKIAVAAQNCYKVTNGAFTGEISPGMIKDCGATW
VVLGHSERRHVFGESDELIGQKVAHALAEGLGVIACIGEKLDERE
AGITEKVVFEQTKVIADNVKDWSKVVLAYEPVWAIGTGKTATPQQ
AQEVHEKLRGWLKSNVSDAVAQSTRIIYGGSVTGATCKELASQPD
VDGFLVGGASLKPEFVDIINAKQ

>TPIS_YEAST 酵母 "Triosephosphate isomerase (EC 5.
ARTFFVGGNFKLNGSKQSIKEIVERLNTASIPENVEVVICPPATY
LDYSVSLVKKPQVTVGAQNAYLKASGAFTGENSVDQIKDVGAKWV
ILGHSERRSYFHEDDKFIADKTKFALGQGVGVILCIGETLEEKKA
GKTLDVVERQLNAVLEEVKDWTNVVVAYEPVWAIGTGLAATPEDA
QDIHASIRKFLASKLGDKAASELRILYGGSANGSNAVTFKDKADV
DGFLVGGASLKPEFVDIINSRN
```

違う生物の同じ機能のタンパク質のアミノ酸配列

トリオースリン酸異性化酵素（Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) (TIM, TPIS)）

```
>TPIS_HUMAN ヒト "Triosephosphate isomerase (EC 5.3
APSRKFFVGGNWKMNGRKQSLGELIGTLNAAKVPADTEVVCAPPT
AYIDFARQKLDPKIAVAAQNCYKVTNGAFTGEISPGMIKDCGATW
VVLGHSERRHVFGESDELIGQKVAHALAEGLGVIACIGEKLDERE
AGITEKVVFEQTKVIADNVKDWSKVVLAYEPVWAIGTGKTATPQQ
AQEVHEKLRGWLKSNVSDAVAQSTRIIYGGSVTGATCKELASQPD
VDGFLVGGASLKPEFVDIINAKQ

>TPIS_ECOLI 大腸菌 "Triosephosphate isomerase (EC 5
MRHPLVMGNWKLNGSRHMVHELVSNLRKELAGVAGCAVAIAPPEM
YIDMAKREAEGSHIMLGAQNVDLNLSGAFTGETSAAMLKDIGAQY
IIIGHSERRTYHKESDELIAKKFAVLKEQGLTPVLCIGETEAENE
AGKTEEVCARQIDAVLKTQGAAAFEGAVIAYEPVWAIGTGKSATP
AQAQAVHKFIRDHIAKVDANIAEQVIIQYGGSVNASNAAELFAQP
DIDGALVGGASLKADAFAVIVKAAEAAKQA
```

進化的なイベント： 置換 と 削除･挿入

トリオースリン酸異性化酵素（Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) (TIM, TPIS)）の場合

ヒト(TPIS_HUMAN)とウサギ(TPIS_RABIT)の比較

```
HUMAN 1:APSRKFFVGGNWKMNGRKQSLGELIGTLNAAKVPADTEVVCAPPTAYIDFARQKLDPKIA:60
       ********************* ***** *******************************
RABIT 1:APSRKFFVGGNWKMNGRKKNLGELITTLNAAKVPADTEVVCAPPTAYIDFARQKLDPKIA:60

TPIS_HUMAN 248 vs TPIS_RABIT 248 SeqID 98.4 %
```

置換(substitution) ： アミノ酸･核酸の変化

ヒト(TPIS_HUMAN)と大腸菌(TPIS_ECOLI)の比較

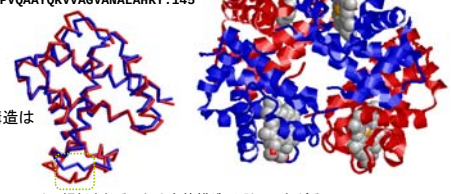
```
HUMAN 4:RKFFVGGNWKMNGRKQSLGELIGTLNAAKVP-ADTEVVCAPPTAYIDFARQKLD-PKIAV:61
        *   * **** **      **   *       *  *  ***  *** *     *
ECOLI 2:RHPLVMGNWKLNGSRHMVHELVSNLRKELAGVAGCAVAIAPPEMYIDMAKREAEGSHIML:61

TPIS_HUMAN 248 vs TPIS_ECOLI 255 SeqID 45.9  %
```

削除･挿入(insertion, deletion ; indel)

配列の類似と立体構造の類似

ヒトのヘモグロビンのα鎖とβ鎖 (SeqID 46.0%)

```
Alpha 2:LSPADKTNVKAAWGKVGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHF-DLS-----HGSAQV:55
         * *  *  * * ****     * * *** *     * *   *  * **      *   *
Beta  3:LTPEEKSAVTALWGKV--NVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPKV:60

Alpha 56:KGHGKKVADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPA:11
          * *****  *      ** *          ** **  ** *** ** **    *    ** *
Beta  61:KAHGKKVLGAFSDGLAHLDNLKGTFATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLVCVLAHHFGK:120

Alpha 116:EFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKY:140
          **** * *    *  * *    *  **
Beta  121:EFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKY:145
```



機能や立体構造は
よく似ている

配列の類似を知ることは立体構造予測につながる

配列比較（配列相同性検索）の基本論理

①2つの DNA / アミノ酸 の文字列が似ている

↓

②進化的に関係がある（相同）から似ている

↓

③進化的に関係があるなら、他の生物学的な性質(機能、立体構造など)も似ているはず

相同性の発見により、他の生物学的な性質を予測できる

類似(similarity)

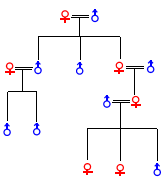
相同（homology）:進化的な原因によるもの。祖先を共有。
（進化史の中である時点まで同じであったから似ている）

相似（analogy）:それ以外の原因によるもの

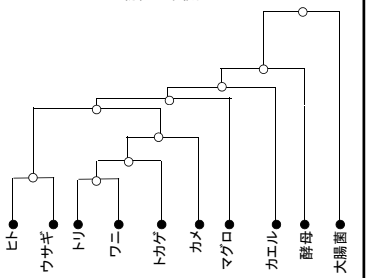
進化のイメージ：系統樹

対象物が生成される過程（歴史、進化史）を木構造で示したもの

家系図



生物種の系統図



2つの配列を比較するには？

1. 類似性のスコア関数の定義

   文字の間の類似性をどうやって定量するか？

```
ACFDE
**  *
ACEEE
```

3つ同じだから3点？
FとEの対応とDとEの対応は等価だろうか？

2. アライメント

   どうやって文字と文字を対応づけるか？

```
ABCDEF      ABCDEF
            ***
CDE         --CDE-

BCDEF       -BCDEF-
            *  **
ABEEFG      AB-EEFG
```

もっと長いときはどうやって計算する？

スコア関数の定義

(1)一致・不一致スコア

$$S(A,B)=\begin{cases}\alpha & A=B\\ \beta & A\neq B\end{cases}$$

もっとも簡単。DNAの場合によく使われる。
BLASTの核酸のデフォルトは、$\alpha=1, \beta=-3$

	A	T	G	C
A	1	−3	−3	−3
T	−3	1	−3	−3
G	−3	−3	1	−3
C	−3	−3	−3	1

#問題点：文字列間の類似性を捉えられない。

L(ロイシン,疎水性) → V(バリン、疎水性)　：起こりやすい

L(ロイシン,疎水性) → E(グルタミン酸、－荷電)　：起こりにくい

(2)対数オッズスコア(log odds score)

$$S(A,B)=\log\frac{P_{evo}(A,B)}{P_{rand}(A)P_{rand}(B)}$$

2つの異なるタンパク質のあるサイトのアミノ酸がA,Bであったとき、

Protein1 : XXXXAXXXX
Protein2 : XXXXBXXXX

$P_{evo}(A,B)$: 進化的な関係からAとBの対応が生じた確率

$P_{rand}(A)\cdot P_{rand}(B)$: 偶然にAとBの対応が生じた確率。

BLOSUM62（blastpのデフォルトで使われている置換スコア行列）

```
#   A  R  N  D  C  Q  E  G  H  I  L  K  M  F  P  S  T  W  Y  V  B  Z  X  *
A  4 -1 -2 -2  0 -1 -1  0 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1  1  0 -3 -2  0 -2 -1  0 -4
R -1  5  0 -2 -3  1  0 -2  0 -3 -2  2 -1 -3 -2 -1 -1 -3 -2 -3 -1  0 -1 -4
N -2  0  6  1 -3  0  0  0  1 -3 -3  0 -2 -3 -2  1  0 -4 -2 -3  3  0 -1 -4
D -2 -2  1  6 -3  0  2 -1 -1 -3 -4 -1 -3 -3 -1  0 -1 -4 -3 -3  4  1 -1 -4
C  0 -3 -3 -3  9 -3 -4 -3 -3 -1 -1 -3 -1 -2 -3 -1 -1 -2 -2 -1 -3 -3 -2 -4
Q -1  1  0  0 -3  5  2 -2  0 -3 -2  1  0 -3 -1  0 -1 -2 -1 -2  0  3 -1 -4
E -1  0  0  2 -4  2  5 -2  0 -3 -3  1 -2 -3 -1  0 -1 -3 -2 -2  1  4 -1 -4
G  0 -2  0 -1 -3 -2 -2  6 -2 -4 -4 -2 -3 -3 -2  0 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -1 -4
H -2  0  1 -1 -3  0  0 -2  8 -3 -3 -1 -2 -1 -2 -1 -2 -2  2 -3  0  0 -1 -4
I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3  4  2 -3  1  0 -3 -2 -1 -3 -1  3 -3 -3 -1 -4
L -1 -2 -3 -4 -1 -2 -3 -4 -3  2  4 -2  2  0 -3 -2 -1 -2 -1  1 -4 -3 -1 -4
K -1  2  0 -1 -3  1  1 -2 -1 -3 -2  5 -1 -3 -1  0 -1 -3 -2 -2  0  1 -1 -4
M -1 -1 -2 -3 -1  0 -2 -3 -2  1  2 -1  5  0 -2 -1 -1 -1 -1  1 -3 -1 -1 -4
F -2 -3 -3 -3 -2 -3 -3 -3 -1  0  0 -3  0  6 -4 -2 -2  1  3 -1 -3 -3 -1 -4
P -1 -2 -2 -1 -3 -1 -1 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -4  7 -1 -1 -4 -3 -2 -2 -1 -2 -4
S  1 -1  1  0 -1  0  0  0 -1 -2 -2  0 -1 -2 -1  4  1 -3 -2 -2  0  0  0 -4
T  0 -1  0 -1 -1 -1 -1 -2 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1  1  5 -2 -2  0 -1 -1  0 -4
W -3 -3 -4 -4 -2 -2 -3 -2 -2 -3 -2 -3 -1  1 -4 -3 -2 11  2 -3 -4 -3 -2 -4
Y -2 -2 -2 -3 -2 -1 -2 -3  2 -1 -1 -2 -1  3 -3 -2 -2  2  7 -1 -3 -2 -1 -4
V  0 -3 -3 -3 -1 -2 -2 -3 -3  3  1 -2  1 -1 -2 -2  0 -3 -1  4 -3 -2 -1 -4
B -2 -1  3  4 -3  0  1 -1  0 -3 -4  0 -3 -3 -2  0 -1 -4 -3 -3  4  1 -1 -4
Z -1  0  0  1 -3  3  4 -2  0 -3 -3  1 -1 -3 -1  0 -1 -3 -2 -2  1  4 -1 -4
X  0 -1 -1 -1 -2 -1 -1 -1 -1 -1 -1 -1 -1 -1 -2  0  0 -2 -1 -1 -1 -1 -1 -4
* -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4 -4  1
```

スコアの計算例

```
AFDC      S(A,A) + S(F,E)  S(D,E) + S(C,C) = 12
AEEC      4        -3        2        9
```

ギャップがある場合はギャップのスコア（ギャップペナルティ）を設定する

```
AFDGC     S(A,A) + S(F,E) + S(D,E) + gap + S(C,C) = 10
AEE-C     4        -3        2        -2     9
```

アライメント

スコア関数（ギャップを含む）を最大にするような文字の対応つけを探す

1. ギャップなしアライメント
2. ギャップありアライメント

ギャップなし
AFDC
AEEC

ギャップあり
AFAED-C
A--EEGC

a. グローバルアライメント (ClustalW)
b. ローカルアライメント (FASTA, BLAST)

ACDEFGHKLM
AFGHKKL
➡
ACDEFGHK-LM
A---FGHKKL-
グローバル

FGHK-L
FGHKKL
ローカル

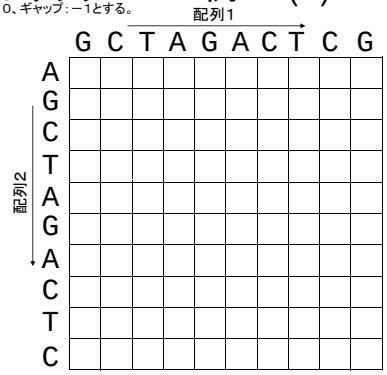
動的計画法というアルゴリズムで解く。
そのイメージをつかむためには**ドットマトリックス法**が有効

ドットマトリックス ： 例1 (1)

※スコア：一致：＋1、不一致：0、ギャップ：－1とする。

1:GCTAGACTCG
2:AGCTAGACTC

(1)配列1、配列2を横と縦に並べる



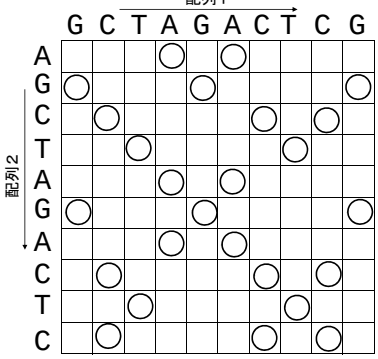
ドットマトリックス ： 例1 (2)

※スコア：一致：＋1、不一致：0、ギャップ：－1とする。

1:GCTAGACTCG
2:AGCTAGACTC

(1)配列1、配列2を横と縦に並べる

(2)文字が一致するマスに○を描く



ドットマトリックス ： 例1 (3)

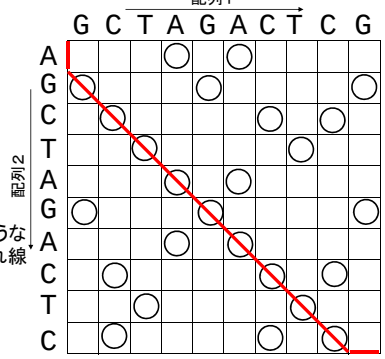
※スコア：一致：＋1、不一致：0、ギャップ：－1とする。

1:GCTAGACTCG
2:AGCTAGACTC

(1)配列1、配列2を横と縦に並べる

(2)文字が一致するマスに○を描く

(3)多くの○を通るような左上と右下を結ぶ折れ線



ドットマトリックス ： 例1 (4)

※スコア：一致：＋1、不一致：0、ギャップ：－1とする。

1:GCTAGACTCG
2:AGCTAGACTC

(1)配列1、配列2を横と縦に並べる

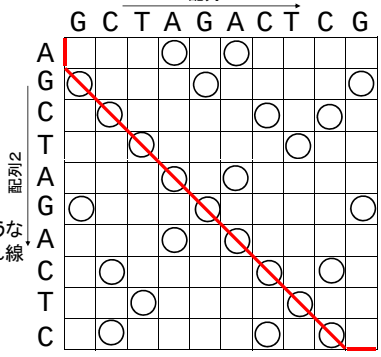
(2)文字が一致するマスに○を描く

(3)多くの○を通るような左上と右下を結ぶ折れ線

(4)アライメント

```
1:-GCTAGACTCG
  *********
2:AGCTAGACTC-
```

スコア：一致(＋1)×9＋不一致(0)×0＋ギャップ(－1)×2＝7

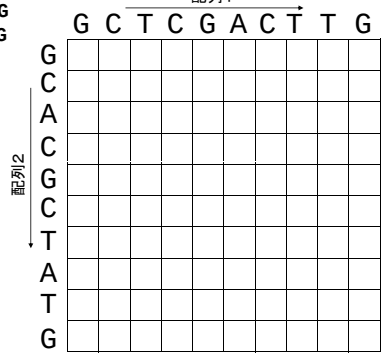


ドットマトリックス ： 例2 (1)

※スコア：一致：＋1、不一致：0、ギャップ：－1とする。

配列1:GCTCGACTTG
配列2:GCACGCTATG

(1)配列1、配列2を横と縦に並べる



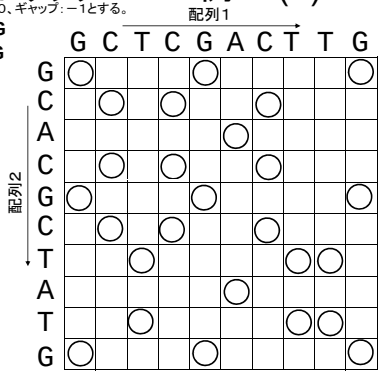
ドットマトリックス ： 例2 (2)

※スコア：一致：＋1、不一致：0、ギャップ：－1とする。

配列1：**GCTCGACTTG**
配列2：**GCACGCTATG**

(1)配列1、配列2を横と縦に並べる

(2)文字が一致するマスに○を描く



ドットマトリックス ： 例2 (3)

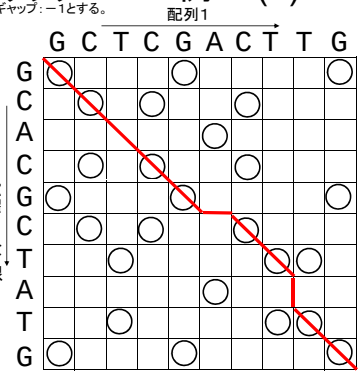
※スコア：一致：＋1、不一致：0、ギャップ：－1とする。

配列1：**GCTCGACTTG**
配列2：**GCACGCTATG**

(1)配列1、配列2を横と縦に並べる

(2)文字が一致するマスに○を描く

(3)多くの○を通るような左上と右下を結ぶ折れ線



ドットマトリックス ： 例2 (4)

※スコア：一致：＋1、不一致：0、ギャップ：－1とする。

配列1：**GCTCGACTTG**
配列2：**GCACGCTATG**

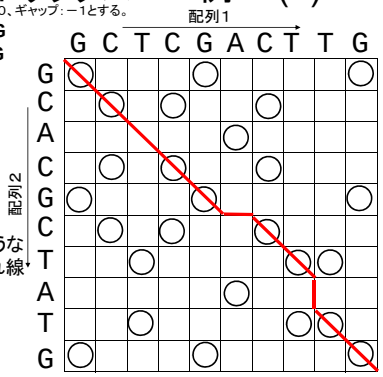
(1)配列1、配列2を横と縦に並べる

(2)文字が一致するマスに○を描く

(3)多くの○を通るような左上と右下を結ぶ折れ線

(4)アライメント

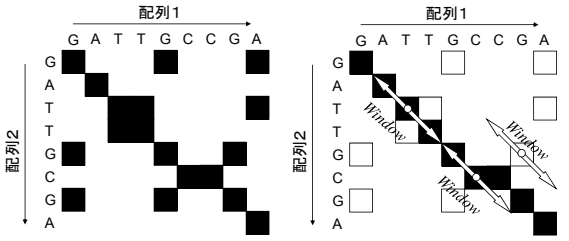
1:GCTCGACT-TG
**** ** ** ****
2:GCACG-CTATG



スコア：一致(＋1)×8＋不一致(0)×1＋ギャップ(－1)×2＝6

対角上の平均化によるスムージング

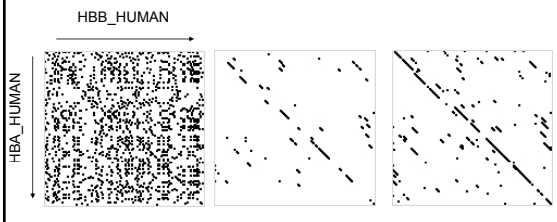
配列1：**GATTGCCGA**
配列2：**GATTGCGA**



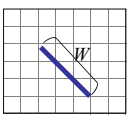
(1)単純に一致している座標を黒く塗る
Window=1, *Threshold*=1に相当

(2)長さ*Window*の連続したペアが比較し、一致度が*Threshold*以上であれば黒く塗る
Window=3, *Threshold*=2の場合

ドットマトリックスの例



Matrix=ID,W=1,T=1　Matrix=ID,W=5,T=3　Matrix=BLOSUM62, W=7,T=10

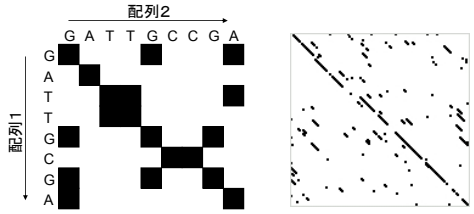


文字が一致しているペアを黒く塗る
→ 長さWのwordの総スコアがT以上なら中心を黒く塗る

スコアは、最も簡単には一致・不一致スコア
対数オッズスコアを使うとより高感度になる

ドットマトリックス法の特徴

- アルゴリズムが平易
- 非常に長い配列の比較にも対応
- 部分一致、繰り返しなど特殊なケースにも対応できる。
- あくまでグラフィカルな対応なので、具体的な文字列対応（アライメント）は与えない。

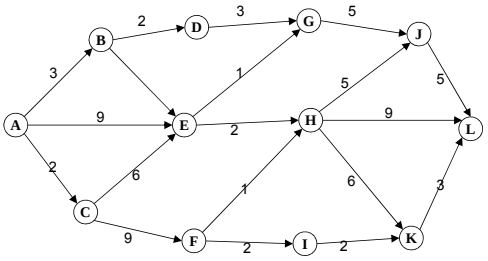


動的計画法によるアライメント

- アライメント問題は、有向グラフの最適経路問題と等価
- 有向グラフの最適経路問題は動的計画法（Dynamic Programming)と呼ばれるアルゴリズムで解ける。
- *O(NM)*の計算量（文字列長の積に比例）

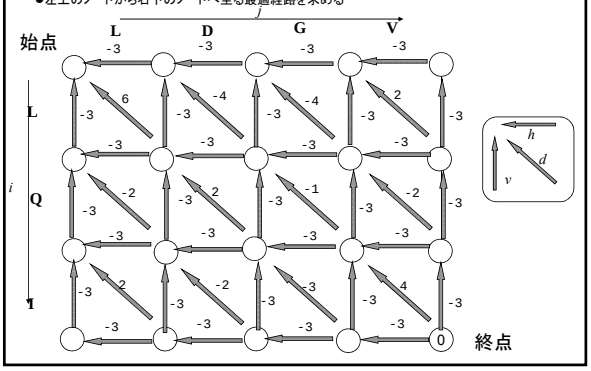
最適経路問題

始点Aから終点Lにいたるエッジの得点の合計が最大となる経路を探す



アライメントを最適経路問題として考える

- 鉛直、水平に比較したい文字列を並べる
- 対角線のエッジには一致スコア、鉛直水平のエッジにはギャップスコアを書き込む
- 左上のノードから右下のノードへ至る最適経路を求める



グローバル・アライメントの解法 (Needleman & Wunsh,1970)

(0)準備

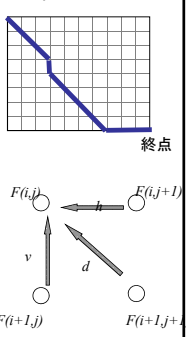
右端の列、下端の行の格子点のスコアを0に設定

(1)前向きステップ

$$F(i,j)=\max\begin{cases}F(i+1,j+1)+S(x_i,y_j) & \text{対角}(d)\\ F(i+1,j)+Gap & \text{鉛直}(v)\\ F(i,j+1)+Gap & \text{水平}(h)\end{cases}$$

(2)後ろ向きステップ

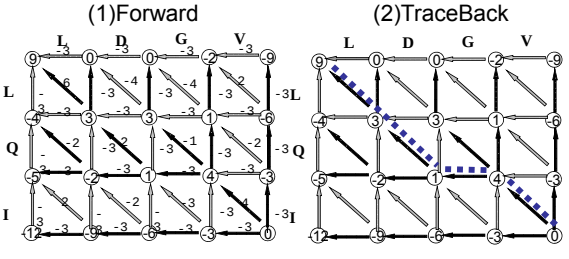
始点を起点にして辿る。終点に到着したら終了。



動的計画法の手続き

(1)Forward

(2)TraceBack



O(NM)

LDGV
LQ-I

グローバルとローカルの格子上の違い

ACDEFGHKLM
AFGHKKL

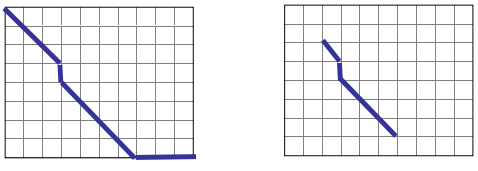
➡

ACDEFGHK-LM
A---FGHKKL-

グローバル

FGHK-L
FGHKKL

ローカル

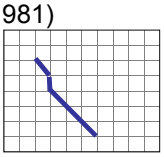


グローバル　　ローカル

ローカルアライメントの解法
(Smith & Waterman,1981)

(0)準備

格子の端のスコアを0に設定



(1)前向きステップ

$$F(i,j)=\max\begin{cases}F(i+1,j+1)+s(x_i,y_j) & \text{対角}(d)\\ F(i+1,j)+Gap & \text{鉛直}(v)\\ F(i,j+1)+Gap & \text{水平}(h)\\ 0 & \text{終結}(0)\end{cases}$$

(2)後ろ向きステップ

最大のスコアのノードを探し、そのノードを起点にして辿る。パス'0'が現れたら終了

配列相同性検索

－ BLASTを中心として －

配列相同性検索

→クエリ配列を配列データベースと比較、相同な配列を探す

- 機能未知遺伝子の機能予測（アノテーション）
  機能既知の配列との類似→機能の類似を示唆
- 立体構造予測
  構造既知の配列との類似→構造の類似を示唆
- 遺伝子発見
  既知遺伝子と類似している領域の発見→遺伝子の存在を示唆

配列データベースの中からクエリ配列と類似したエントリを見つけるには？

→ 動的計画法を繰り返し実行すればよい

1. いかに高速に計算を実行するか
   動的計画法は$O(NM)$の計算時間
   1,000～100,000配列の検索には時間がかかる
   → 高度なヒューリスティック解法の導入
2. どれだけ似ていれば意味があるのか？
   何をもって類似性の指標とするのか
   同一残基率(%)、スコア？
   →統計的有意性の判断の導入

BLASTのアライメントアルゴリズム

動的計画法を使わず、独自のヒューリスティックアルゴリズムを開発

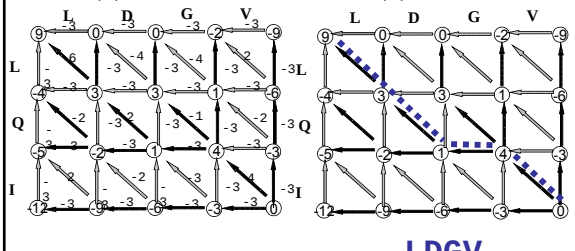
ヒューリスティック：常に正しい解を返すわけではないが、多くの場合まあまあの解を返すことが経験的に知られているアルゴリズム

153残基のクエリ配列を5977配列のデータベースと比較に要した時間(Pentium4)

私が書いたDP	16.989 sec
SSEARCH	2.911 sec
FASTA(ktup=1)	1.226 sec
FASTA(ktup=2)	0.608 sec
BLASTP	0.118 sec

動的計画法の復習

(1)Forward　　(2)TraceBack



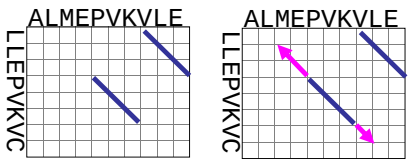
$O(NM)$

LDGV
LQ-I

BLASTのヒューリスティックス

目標：Smith&Watermanのローカルアライメントの近似解

1. クエリの各wordに対し近隣wordのリストを作成
2. 近隣wordリストを用いてデータベースを検索
3. ヒットしたwordをungapで伸展(HSP)
4. さらにgap入りアライメントで伸展



BLASTの出力例(1)

```
BLASTP 2.2.1 [Apr-13-2001]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer,
Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997),
"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= RECA_ECOLI "RecA protein (Recombinase A)"
         (352 letters)

Database: 4oscop1.ssnm
           3886 sequences; 705,110 total letters

Searching.....done

                                                                 Score    E
Sequences producing significant alignments:                      (bits) Value

2reb-1 [c.37.1.11] RECA PROTEIN (E.C.3.4.99.37)                   448  6-127
1g18A2 [d.48.1.1] RECA PROTEIN                                     70  9e-14
1g0uF [d.153.1.4] PROTEASOME COMPONENT C1                          32  0.020
1byrA [d.136.1.1] ENDONUCLEASE                                     28  0.29
1g3qA [c.37.1.10] CELL DIVISION INHIBITOR                          28  0.38
1ct5A [c.1.6.2] YEAST HYPOTHETICAL PROTEIN, SELENOMET              28  0.49
1g0uD [d.153.1.4] PROTEASOME COMPONENT PUP2                        27  1.1
1e32A2 [c.37.1.13] P97                                             26  1.4
1g0uA [d.153.1.4] PROTEASOME COMPONENT Y7                          26  1.9
1cp2A [c.37.1.10] NITROGENASE IRON PROTEIN                         26  1.9
1f3oA [c.37.1.12] HYPOTHETICAL ABC TRANSPORTER ATP-BINDING PROTEIN 25  2.4
1qj2B2 [d.133.1.1] CARBON MONOXIDE DEHYDROGENASE                   25  3.2
1dgvA [c.72.1.1] ADENOSINE KINASE                                  25  3.2
1skyB3 [c.37.1.11] F1-ATPASE                                       25  3.2
1g6oA [c.37.1.13] CAG-ALPHA                                        25  4.2
1cmxA [d.3.1.6] UBIQUITIN YUH1-UBAL                                24  7.1
8abp- [c.93.1.1] L-*ARABINOSE-BINDING PROTEIN (MUTANT WITH MET 1...  24  7.1
2tpsA [c.1.3.1] THIAMIN PHOSPHATE SYNTHASE                         24  7.1
```

```
1pmi- [b.82.1.3] PHOSPHOMANNOSE ISOMERASE                          23  9.3

>2reb-1 [c.37.1.11] RECA PROTEIN (E.C.3.4.99.37)
          Length = 243

 Score =  448 bits (1152), Expect = e-127
 Identities = 243/266 (91%), Positives = 243/266 (91%), Gaps = 23/266 (8%)

Query: 3   DENKQKALAAALGQIEKQFGKGSIMRLGEDRSMDVETISTGSLSLDIALGAGGLPMGRIV 62
           DENKQKALAAALGQIEKQFGKGSIMRLGEDRSMDVETISTGSLSLDIALGAGGLPMGRIV
Sbjct: 1   DENKQKALAAALGQIEKQFGKGSIMRLGEDRSMDVETISTGSLSLDIALGAGGLPMGRIV 60

Query: 63  EIYGPESSGKTTLTLQVIAAAQREGKTCAFIDAEHALDPIYARKLGVDIDNLLCSQPDTG 122
           EIYGPESSGKTTLTLQVIAAAQREGKTCAFIDAEHALDPIYARKLGVDIDNLLCSQPDTG
Sbjct: 61  EIYGPESSGKTTLTLQVIAAAQREGKTCAFIDAEHALDPIYARKLGVDIDNLLCSQPDTG 120

Query: 123 EQALEICDALARSGAVDVIVVDSVAALTPKAEIEGEIGDSHMGLAARMMSQAMRKLAGNL 182
           EQALEICDALARSGAVDVIVVDSVAALTPKAEIE        GLAARMMSQAMRKLAGNL
Sbjct: 121 EQALEICDALARSGAVDVIVVDSVAALTPKAEIE--------GLAARMMSQAMRKLAGNL 172

Query: 183 KQSNTLLIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRIGAVKEGENVVGSET 242
           KQSNTLLIFINQ              TGGNALKFYASVRLDIRRIGAVKEGENVVGSET
Sbjct: 173 KQSNTLLIFINQ--------------TGGNALKFYASVRLDIRRIGAVKEGENVVGSET 217

Query: 243 RVKVVKNKIAAPFKQAEFQILYGEGI 268
           RVKVVKNKIAAPFKQAEFQILYGEGI
Sbjct: 218 RVKVVKNKIAAPFKQAEFQILYGEGI 243


>1g18A2 [d.48.1.1] RECA PROTEIN
          Length = 60

 Score = 70.1 bits (170), Expect = 9e-14
 Identities = 30/56 (53%), Positives = 44/56 (78%)

Query: 272 GELVDLGVKEKLIEKAGAWYSYKGEKIGQGKANATAWLKDNPETAKEIEKKVRELL 327
           G L+D+GV + LI K+GAW++Y+GE++GQGK NA  +L +N + A EIEKK++E L
Sbjct: 4   GSLIDMGVDQGLIRKSGAWFTYEGEQLGQGKENARNFLVENADVADEIEKKIKEKL 59
```

BLASTの出力例(2)

BLASTの出力例(3)

```
>1g18A2 [d.48.1.1] RECA PROTEIN
          Length = 60

 Score = 70.1 bits (170), Expect = 9e-14
 Identities = 30/56 (53%), Positives = 44/56 (78%)

Query: 272 GELVDLGVKEKLIEKAGAWYSYKGEKIGQGKANATAWLKDNPETAKEIEKKVRELL 327
           G L+D+GV + LI K+GAW++Y+GE++GQGK NA  +L +N + A EIEKK++E L
Sbjct: 4   GSLIDMGVDQGLIRKSGAWFTYEGEQLGQGKENARNFLVENADVADEIEKKIKEKL 59


>1g0uF [d.153.1.4] PROTEASOME COMPONENT C1
          Length = 242

 Score = 32.3 bits (72), Expect = 0.020
 Identities = 25/88 (28%), Positives = 47/88 (53%), Gaps = 9/88 (10%)

Query: 271 YGELVDLGVKEKLIEKAGAWYSYKGEKIGQGKANATAWLK----DNPE--TAKEIEKKVR 324
           +G +   G    ++E +G+++ YKG   G+G+ +A A L+        +PE  +A+E  K+
Sbjct: 132 FGGVDKNGAHLYMLEPSGSYWGYKGAATGKGRQSAKAELEKLVDHHPEGLSAREAVKQAA 191

Query: 325 EL--LLSNPNSTPDFSVDDSE-GVAETN 349
           ++  L    N   DF ++ S   ++ETN
Sbjct: 192 KIIYLAHEDNKEKDFELEISWCSLSETN 219


>1byrA [d.136.1.1] ENDONUCLEASE
          Length = 152

 Score = 28.5 bits (62), Expect = 0.29
 Identities = 28/102 (27%), Positives = 46/102 (44%), Gaps = 19/102 (18%)
```

どれだけ似ていれば意味があるのか？
類似性の指標

- **同一残基率(%)**
  直感的にわかりやすい。一般に30%ぐらいがしきい値とされる。
  感度が低く、アライメントの長さや不一致ペアの類似性に鈍感

```
SLKA
*  *
SELA
```
4/8 = 50 %
Score = 4

```
SLKALLNKCKTFGWGAQ
*   **    ** * **
SIRALDRRCKSFAWGKE
```
8/16 = 50 %
Score = 55

- **スコア**
  同一残基率より感度は高いが、比較する配列の長さに依存。長いほど高いスコアになる。

- **E-value**
  スコアの統計的有意性。
  ランダムな配列を比較した場合に、そのスコアが生じる可能性を見積もる。

E-value

E-value (expectation value)
ランダムな配列データベースを検索したときに、
そのスコアS以上の値になるアライメントの本数の期待値

ランダムな配列とは：アミノ酸がランダムな順序に並んだ配列。ただし、
アミノ酸の組成 → 平均的な値に従うとする
アミノ酸の長さ → 比較したアミノ酸の同じにする。

論理の流れ

ランダムな配列では起こりえないスコア
→ 偶然では起こりえないスコア → 進化的に関係がある類似性に違いない

値の大きさ

単位は本。小さいほどよく似ている。 必ず0以上の値になる。

しきい値

原理的には1。経験的には0.0001から0.01ぐらい。

E-valueの計算に必要なパラメータ

$$E(S) = Kmn \cdot e^{-\lambda S}$$

- パラメータ定数K,λ
  →スコア行列とギャップペナルティに依存
- m:クエリの残基長
- n : データベースの残基長
  データベースに含まれる全ての配列を一つにつなげた場合の長さ

・クエリ配列長とデータベースの大きさにE-valueは比例
・比較した配列が同じでも、データベースのほかの配列の数が変わると、E-valueも変わってしまう。

```
BLASTP 2.2.1 [Apr-13-2001]


Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer,
Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997),
"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
programs",  Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= RECA_ECOLI "RecA protein (Recombinase A)"
         (352 letters)

Database: 40scop1.59nm
           3886 sequences; 705,110 total letters

Searching.....done

                                                                   Score     E
Sequences producing significant alignments:                        (bits)  Value

2reb-1 [c.37.1.11] RECA PROTEIN (E.C.3.4.99.37)                      448  e-127
1g18A2 [d.48.1.1] RECA PROTEIN                                        70  9e-14
1g0uF [d.153.1.4] PROTEASOME COMPONENT C1                             32  0.020
1byrA [d.136.1.1] ENDONUCLEASE                                        28  0.29
1g3qA [c.37.1.10] CELL DIVISION INHIBITOR                             28  0.38
1ct5A [c.1.6.2] YEAST HYPOTHETICAL PROTEIN, SELENOMET                 28  0.49
1g0uD [d.153.1.4] PROTEASOME COMPONENT PUP2                           27  1.1
1e32A2 [c.37.1.13] P97                                                26  1.4
1g0uA [d.153.1.4] PROTEASOME COMPONENT Y7                             26  1.9
1cp2A [c.37.1.10] NITROGENASE IRON PROTEIN                            26  1.9
1f3oA [c.37.1.12] HYPOTHETICAL ABC TRANSPORTER ATP-BINDING PROTEIN    25  2.4
1qj2B2 [d.133.1.1] CARBON MONOXIDE DEHYDROGENASE                      25  3.2
1dgvA [c.72.1.1] ADENOSINE KINASE                                     25  3.2
```

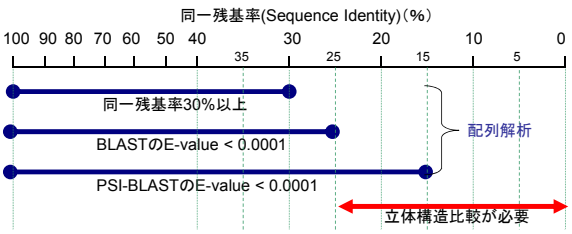
```
Query: 123 EQALEICDALARSGAVDVIVVDSVAALTPKAEIEGEIGDSHMGLAARMMSQAMRKLAGNL 182
           EQALEICDALARSGAVDVIVVDSVAALTPKAEIE        GLAARMMSQAMRKLAGNL
Sbjct: 121 EQALEICDALARSGAVDVIVVDSVAALTPKAEIE--------GLAARMMSQAMRKLAGNL 172

Query: 183 KQSNTLLIFINQIRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRIGAVKEGENVVGSET 242
           KQSNTLLIFINQ              TGGNALKFYASVRLDIRRIGAVKEGENVVGSET
Sbjct: 173 KQSNTLLIFINQ---------------TGGNALKFYASVRLDIRRIGAVKEGENVVGSET 217

Query: 243 RVKVVKNKIAAPFKQAEFQILYGEGI 268
           RVKVVKNKIAAPFKQAEFQILYGEGI
Sbjct: 218 RVKVVKNKIAAPFKQAEFQILYGEGI 243
```

Bit Score　　Raw Score

```
>1g18A2 [d.48.1.1] RECA PROTEIN
          Length = 60

 Score = 70.1 bits (170), Expect = 9e-14
 Identities = 30/56 (53%), Positives = 44/56 (78%)

Query: 272 GELVDLGVKEKLIEKAGAWYSYKGEKIGQGKANATAWLKDNPETAKEIEKKVRELL 327
           G L+D+GV + LI K+GAW++Y+GE++GQGK NA  +L +N + A EIEKK+E L
Sbjct: 4   GSLIDMGVDQGLIRKSGAWFTYEGEQLGQGKENARNFLVENADVADEIEKKIKEKL 59


>1g0uF [d.153.1.4] PROTEASOME COMPONENT C1
          Length = 242

 Score = 32.3 bits (72), Expect = 0.020
 Identities = 25/88 (28%), Positives = 47/88 (53%), Gaps = 9/88 (10%)

Query: 271 YGELVDLGVKEKLIEKAGAWYSYKGEKIGQGKANATAWLK----DNPE--TAKEIEKKVR 324
```

```
   Database: 40scop1.59nm
     Posted date:  Jun 22, 2002  3:06 PM
   Number of letters in database: 705,110
   Number of sequences in database:  3886
 Lambda     K      H
    0.314    0.134    0.369
 Gapped
 Lambda     K      H
    0.267   0.0410    0.140
 Matrix: BLOSUM62
 Gap Penalties: Existence: 11, Extension: 1
 Number of Hits to DB: 469,543
 Number of Sequences: 3886
 Number of extensions: 18494
 Number of successful extensions: 65
 Number of sequences better than 10.0: 17
 Number of HSP's better than 10.0 without gapping: 13
 Number of HSP's successfully gapped in prelim test: 4
 Number of HSP's that attempted gapping in prelim test: 50
 Number of HSP's gapped (non-prelim): 17
 length of query: 352
 length of database: 705,110
 effective HSP length: 79
 effective length of query: 273
 effective length of database: 398,116
 effective search space: 108685668
 effective search space used: 108685668
```

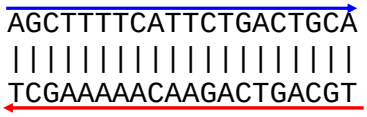
タンパク質の相同性の判断基準



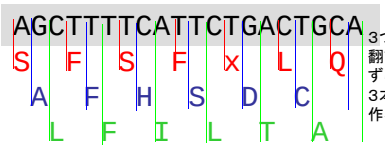
BLASTのプログラムの種類

	クエリ配列	データベース配列	比較回数	典型的な使用目的
blastn	核酸	核酸	2回 相補鎖にしたDB配列とも比較	ゲノムDNAのアノテーション、cDNAのゲノムへのマッピング、非コーディング領域の比較
blastp	アミノ酸	アミノ酸	1回	タンパク質配列からの比較的遠縁のホモログの発見
blastx	核酸(を翻訳したアミノ酸)	アミノ酸	6回 クエリから6通りのアミノ酸配列を生成して比較	ゲノムDNAから遺伝子(タンパク質をコードしている領域)を発見する
tblastn	アミノ酸	核酸(を翻訳したアミノ酸)	6回 クエリから6通りのアミノ酸配列を生成して比較	あるタンパク質をコードしているゲノムの領域を発見する
tblastn	核酸(を翻訳したアミノ酸)	核酸(を翻訳したアミノ酸)	36回 クエリ、DBとも6通りのアミノ酸配列を生成して比較	やや遠縁の生物種のゲノムを、その中にコードされたタンパク質で比較。DBに登録されていない遺伝子の発見を期待。

DNAには相補鎖があり、それぞれ3つのアミノ酸の読み枠がある



DNAは二重らせん構造を作っているため、A⇔T、G⇔Cに入れ替えて、向きを逆にした相補鎖があるはず。



3つの核酸が1つのアミノ酸に翻訳されるので、読み枠をずらせば一本の核酸配列から3本のアミノ酸配列を作ることができる

※核酸よりアミノ酸で比較したほうがより遠縁のホモログを認識可能

blastp(アミノ酸対アミノ酸)によるタンパク質の機能予測

クエリ:*T.thermophius*のタンパク質, データベース:大腸菌の全タンパク質

```
BLASTP 2.2.3 [May-13-2002]
Query= X07 AAS80531.1 tthe0          (144 letters)
Database: ecoli_aa              4237 sequences; 1,350,094 total letters

                                                                  Score    E
Sequences producing significant alignments:                       (bits) Value

infC NP_416233.1 "protein chain initiation factor IF-3" NC_000913     137   2e-34
rhsD NP_415030.1 "RhsD protein in RhsD element" NC_000913              28   0.19
pta NP_416800.1 "phosphotransacetylase" NC_000913                      25   2.0
prsA NP_415725.1 "phosphoribosylpyrophosphate synthetase" NC_000913    25   2.7
yiaK NP_418032.1 "2,3-diketo-L-gulonate dehydrogenase, NADH-depe...    24   3.5
ffh NP_417101.1 "4.5S-RNP protein, GTP-binding export factor, pa...    24   4.6
ybdR NP_415141.1 "putative dehydrogenase, NAD(P)-binding" NC_000913    24   4.6
ydfG NP_416057.1 "putative oxidoreductase" NC_000913                   23   7.8

>infC NP_416233.1 "protein chain initiation factor IF-3" NC_000913
          Length = 180

 Score =  137 bits (346), Expect = 2e-34
 Identities = 72/139 (51%), Positives = 92/139 (65%), Gaps = 1/139 (0%)

Query: 4   REALRLAQEMDLDLVLVGPNADPPVARIMDYSKWRYEQQMXXXXXXXXXXXTEVKSIKFR 63
            REAL  A+E  +DLV + PNA+PPV RIMDY K+ YE+                +VK IKFR
Sbjct: 40  REALEKAEEAGVDLVEISPNAEPPVCRIMDYGKFLYEKSKSSKEQKKKQKVIQVKEIKFR 99

Query: 64  VKIDEHDYQTKLGHIKRFLQEGHKVKVTIMFRGREVAHPELGERILNRVTEDLKDLAVVE 123
               DE DYQ KL  + RFL+EG K K+T+ FRGRE+AH ++G  +LNRV +DL++LAVVE
Sbjct: 100 PGTDEGDYQVKLRSLIRFLEEGDKAKITLRFRGREMAHQQIGMEVLNRVKDDLQELAVVE 159
```

blastp(アミノ酸対アミノ酸)の適用例)

ORFのアノテーション:*H.influenzae*のORF対大腸菌のORF

```
Query= HI0078 hinf0 AAC21753.1
                                                                  Score    E
Sequences producing significant alignments:                       (bits) Value

cysS ecol0 AAC73628.1 "cysteine tRNA synthetase"                    730   0.0
metG ecol0 AAC75175.1 "methionine tRNA synthetase"                   39   5e-04
ileS ecol0 AAC73137.1 "isoleucine tRNA synthetase"                   39   0.001
leuS ecol0 AAC73743.1 "leucine tRNA synthetase"                      30   0.25
yidW ecol0 AAC76718.1 "regulator protein for dgo operon"             28   1.3
```

→ HI0078はcysteine tRNA syntetase

```
Query= HI0083 hinf0 AAC21762.1
        (71 letters)                                              Score    E
Sequences producing significant alignments:                       (bits) Value

ispB ecol0 AAC76219.1 "octaprenyl diphosphate synthase"              23   3.1
lplA ecol0 AAC77339.1 "lipoate-protein ligase A"                     22   6.9
nlpA ecol0 AAC76684.1 "lipoprotein-28"                               22   6.9
b1372 ecol0 AAC74454.1 "putative membrane protein"                   22   6.9
mdaA ecol0 AAC73938.1 "modulator of drug activity A"                 22   9.0
```

→ HI0083は大腸菌にはホモログがない

参考文献

- 金久實 著 「ポストゲノム情報への招待」 (2001) 共立出版
- 中村保一他編 「バイオデータベースとウェブツールの手とり足とり活用法 改訂第2版」 (2007) 羊土社
- Arthur M.Lesk(岡崎康司、坊農秀雄 監訳)「バイオインフォマティクス基礎講義 ー歩進んだ発想をみがくために」(2003), メディカル・サイエンス・インターナショナル
- D.W.Mount著、岡崎康司、坊農秀雄 監訳「バイオインフォマティクス – ゲノム配列から機能解析へ ー」 第2版 メディカル・インターナショナル、2005年、11500円
- 阿久津達也 「バイオインフォマティクスの数理とアルゴリズム」(2007) 共立出版
- R.Durbin 他著、阿久津達也他訳 「バイオインフォマティクス - 確率モデルによる遺伝子解析」医学出版、2001年、9800円
- BLAST WEB page http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/