

令和元年6月12日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06846

研究課題名(和文)リン酸化シグナルをターゲットにした非遺伝毒性発がん物質スクリーニング法の開発

研究課題名(英文)The prediction of the mutational effects on the phosphorylation motifs in cancer cells

研究代表者

吉崎 尚良 (YOSHIZAKI, Hisayoshi)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：00443490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん組織における遺伝子変異の多くはタンパク質リン酸化に関係する遺伝子である。しかし、その基質であるリン酸化サイトに入る変異はがん化への影響を持つことが予想されるものの、その細胞がん化への影響は、ほとんど明らかにされていない。我々は、リン酸化モチーフに注目し、ヒトがん組織におけるリン酸化モチーフ上のがん特異的変異を分類、統計処理することで、リン酸化モチーフ上の遺伝子変異の持つ細胞がん化への影響予測を試みた。その結果、がんでは進化的に保存されているリン酸化モチーフに変異が入りやすいことが明らかになり、リン酸化モチーフ上の突然変異は、ランダムでなく自発的に選択された突然変異である事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、膨大なリン酸化サイトを簡便に特徴づけるために、リン酸化サイトの周辺アミノ酸配列の特徴から226のリン酸化モチーフ同定した。これらのデータを使い、がん特異的な変異とリン酸化モチーフとの間に関連性を見出せるか調べた。この結果、がん組織では、生理的 중요性の高いリン酸化モチーフに変異が蓄積しやすいこと、がん組織のリン酸化モチーフ上の変異は、ランダムな変異の挿入でなく自然選択的に挿入されていることを示唆した。がん組織特異的な遺伝子変異情報に、我々のもつリン酸化モチーフデータを組み合わせた本研究は、機能未知のリン酸化サイトへの遺伝子変異における、がん化への影響予測につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated associations between cancer-specific mutations and phosphorylation motifs. Distributions with these mutations and cancer tissues for these mutations and the evolutionary conservation of each phosphorylation motif were investigated. As a result, it was revealed that the frequency of cancer specific mutagenesis on the phosphorylation motif has a positive correlation with the evolutionary conservation of the motif. This means that in cancer tissues, mutations tend to accumulate in physiologically important phosphorylation motifs, mutations on the phosphorylation motif in the cancer tissue are not random mutations due to genomic instability, suggesting spontaneously selective mutations. This study combining tissue specific gene mutation information with our own phosphorylation motif data is expected to lead to predict the effect on canceration by gene mutation, to functionally unknown phosphorylation sites.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：リン酸化モチーフ がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の身の回りに存在する医薬品、機能性食品、化成品に含まれる化学物質の多くは発がん性の有無をガイドラインに従い試験されている。化学物質の発がん作用は、遺伝毒性を持つ物質と非遺伝毒性を持つ物質の二種類に分類される¹。前者は細胞のDNAに直接作用し、細胞の発がんを誘発する。後者は細胞傷害性や細胞内の蛋白質に働きかけるなど、発がんプロモーターとして働く。化学物質の遺伝毒性は、細菌を用いたAmes試験、in vitro代謝活性化系試験、哺乳類培養細胞を用いた染色体損傷試験など簡便な1次スクリーニング法が数多く開発されてきた²。しかし遺伝子に直接作用しない非遺伝毒性発がん物質は動物実験以外に検出法が存在せず、一次スクリーニングとして安価でハイスループットながん原性評価法の開発が望まれている。がんは、さまざまな原因により発生する遺伝子変異が蓄積することで生じる。よって、細胞がん化に関係する遺伝子は、がん組織間で共通した遺伝子変異を調べることで同定されてきた。遺伝毒性発がん物質の発がん性試験は、その発生機序の多様さから、動物実験以外では困難であるとされている。しかし悪性度の高いがん細胞は、足場非依存的な自立増殖、分化の消失、高い解糖性、増殖因子やプロテアーゼの分泌という共通した性質を獲得しており、それぞれの性質によって、関連した蛋白質のリン酸化が発がん細胞間で共通して観察される³。そこで申請者は、がん化した細胞で特異的に入力されるリン酸化シグナルを網羅的に探索し、がん化への影響が高いリン酸化シグナルを同定し、これを非遺伝毒性発がん探索のマーカーにすることを発想した。

2. 研究の目的

既知ドライバー遺伝子や、がんの分子標的薬のターゲットの多くはタンパク質リン酸化に関係する遺伝子である。その基質であるリン酸化サイトに入る変異もがん化への影響を持つことが予想される。しかしながら、その基質であるリン酸化サイトのがんにおける役割は(ヒトで20万サイトがすでに同定されているにもかかわらず)いまだ包括的には明らかにされていない。その大きな原因は、がん組織における低頻度遺伝子変異は著しい不均一性を持つため、一見ランダムに変異が入っているように変異が入っているように見えること⁴、同定されたリン酸化サイトのほとんどが機能未知なうえに生理的重要性が低いと考えられていることである⁵。申請者は、この無数のガラクタの中から生理的に重要なリン酸化サイトを抽出する手段として、ヒトゲノム上のリン酸化サイトを、178のリン酸化モチーフに整理し、さらに生理的重要性と関連するパラメーターとしてリン酸化モチーフの進化的保存性を決定し各リン酸化サイトの性格付けを行ってきた^{6,7}。本研究で我々は、ヒトにおいてリン酸化サイト上のがん特異的変異が細胞がん化にどうかかわるのか包括的に理解するために、このリン酸化モチーフ上の腫瘍組織特異的な変異から、細胞がん化に影響を持つ変異を抽出する方法の開発を行った。さらに、がん組織に導入されたリン酸化モチーフ上の変異が発がん細胞のリン酸化シグナル伝達経路にどのような影響を与えるか予測し、細胞がん化のマーカーや新規の創薬ターゲットにリン酸化モチーフがなり得るか考察する。

3. 研究の方法

(1) リン酸化モチーフの比較進化解析

ヒトゲノム上にコードされている178のモチーフ配列を全セリン、スレオニン、チロシン残基、およびリン酸化が報告されている残基に分類した。リン酸化モチーフを持つリン酸化サイトは、出芽酵母、分裂酵母、線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、イヌ、マウス、チンパンジー、ヒトの9種で比較ゲノム解析を行い、その保存性を調べた。オーソログは、KEGG OCで入手し、MAFFTでアライメントした。

(2) 機能アノテーション解析

リン酸化サイトに変位の入る遺伝子の機能は機能アノテーション解析ツールである Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov>) を使い解析した。遺伝子リストは、UniProt アクセッションに変換し、機能的アノテーション解析にかけた。対応する機能クラスタ中のメンバーP値のスコアを用いて生物学的有意性をランク付けした。

(3) ネットワークベースドエンリッチメント解析

ヒト遺伝子は STRING (<https://string-db.org>) の相互作用データベースから相互作用する遺伝子群と合わせて当該遺伝子のネットワークとし、各モチーフ上へ変異の導入が確認された遺伝子群とフィッシャー検定を行い、ネットワーク上のリン酸化モチーフに入る遺伝子変異の有意性をランク付けした。

4. 研究成果

(1) リン酸化モチーフ上のがん特異的変異とリン酸化モチーフの進化的保存性

我々は、膨大なリン酸化サイトを簡便に特徴づけるために、リン酸化サイトの周辺アミノ酸配列の特徴からモチーフ構造を抽出しモチーフとしてまとめることを試みた。PhosphoSitePlus(<http://www.phosphosite.org>)に登録されている約10万の既知リン酸化サイトをアミノ酸の特徴でクラスタリングし、各クラスタのアミノ酸の分布をもとに178のリン酸化モチーフに整理分類した⁶。これらのデータを使い、がん特異的な変異とリン酸化モチーフとの間に関連性を見出せるか調べた。International Cancer Genome Consortium (ICGC)(<https://icgc.org/>)に登録されている16,164,044のがん特異的変異から、アミノ酸置換のあるリン酸化モチーフ上の114,262変異を抽出し、がん組織でのモチーフへの変異の偏りと各リン酸化モチーフの進化的保存性との間で相関を調べた。この結果、リン酸化モチーフ上のがん特異的変異導入頻度は、リン酸化モチーフの進化的保存性と正の相関を持つことが示された(図1A)。

(2) リン酸化モチーフ上に変位を持つ遺伝子の機能的偏り

リン酸化モチーフ上のがん特異的変位がどのようなタンパク質に多く見られるか調べるために、DAVIDを使い、リン酸化モチーフ変異遺伝子の機能アノテーション解析を行った。その結果、対照とした、リン酸化モチーフ上の一塩基多型(SNPs)と比べ、リン酸化モチーフ上のがん特異的変位は特定の機能を持った分子(chromosome organization, transcription, protein amino acid..., microtubule-based movement, cytoskeletal organization 他)にエンリッチされていることがわかった(図1B)。

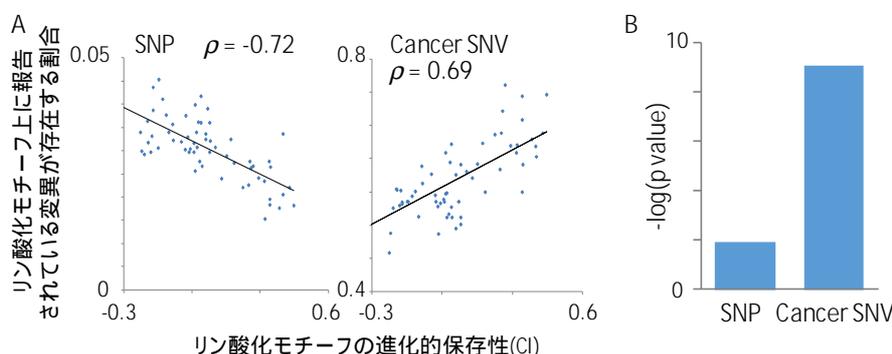


図1 我々の定義したリン酸化モチーフとその上に入る突然変異の特徴

A リン酸化モチーフの進化的保存性(CI)とモチーフ上に存在するSNPの出現率は逆相関、がん突然変異とは相関する。

B リン酸化モチーフ上のがん突然変異を持つ遺伝子のGOエンリッチメント解析上位10カテゴリの平均濃縮スコアはSNPと比べ非常に高い。

(3) リン酸化モチーフ上に入る変位の位置

リン酸化モチーフ上のどの部位に変位が導入されているか、確認したところ、多くのリン酸化モチーフで、基質となるリン酸化サイトより、リン酸化モチーフを構成する周辺アミノ酸への変位の割合の方が多かった。中でもAGCキナーゼやCAMKファミリーの基質となるRXXS/Tがんリン酸化モチーフ上の変異は、基質となるアミノ酸の変異でリン酸化サイトが損なわれることより、リン酸化モチーフの変化で触媒するキナーゼが変化することで、リン酸化シグナルが混乱するほうが、がん化への寄与が高いことを示唆した。

(4) がん組織ごとのリン酸化モチーフ上変異

ICGCに登録されたがん特異的変異情報は、がん組織、患者毎にタグづけされていることから、がんを、膀胱、血液、骨、脳、乳、子宮頸部、結腸直腸、食道、頭頸部、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、前立腺、皮膚、胃、子宮の18組織に分類し、組織毎のリン酸化モチーフ上の変異の入りやすさをヒートマップで確認した。リン酸化モチーフはリン酸化サイトの前後5アミノ酸の11アミノ酸をその領域とし、登録されたがん突然変異数を、リン酸化モチーフを持つリン酸化サイト数の比で現し、ヒートマップで視覚化した。その結果、ほぼ全てのがんでアルギニンの変異頻度が高い傾向が観察された他、皮膚がんではMotif12⁶に顕著な変異の導入が観察された。

(5) 皮膚がんにおける Motif12 変異の特徴

皮膚がんにおいて、どのようなタンパク質に Motif12 変異が導入されているか、機能アノテーション解析で調べたところ、ジンクフィンガーモチーフを持つ転写関連遺伝子、PH、PDZ、SH3ドメインに代表されるセカンドメッセンジャー、リン酸化シグナルに反応するドメインを持つタンパク質に変異が入りやすい傾向が観察された。がん遺伝子に代表されるドライバー遺伝子は、特定の遺伝子への変異の集中だけでなく、シグナル伝達経路への集中もその特徴にもつ。そこで皮膚がんにおける Motif12 変異がどのような遺伝子ネットワークに入りやすいか調べる

ため、ネットワークベースドエンリッチメント解析を行った(表1)。その結果、細胞周期、細胞分裂、DNA ダメージ、細胞骨格制御を行っている Rho ファミリーシグナリングに関係するシグナル伝達経路に変異が有意に導入されていることが明らかになった。

表1 皮膚がんMotif12変異が有意に導入される遺伝子ネットワーク

Network genes	P-value	Q-value	Keywords
Q09028,Q71F23,P04637,Q13112,P35226,O14686,Q96GY3,Q14686,O94776,Q8NCD3,O95503 P10244,Q08999,O43189,P30876,O75376,P06748,Q9ULD4,Q8NEZ4,Q13111,Q14209,P55347 .Q9NRL2,Q09472,Q15361,Q92833,Q12830,Q9BQA1,Q9HC52,Q9NP11,Q6P0N0,O95696,O753 62,P84022,Q14157,Q9UBC3,P11388,P30304 P60953,Q9BZ29,P46108,Q71F23,Q92608,Q15019,Q96P48,Q14814,Q07889,Q6XZF7,Q06187, Q12929,O94887,Q13469,P98174,Q96PE2,Q15311,Q9NZM3,P25054,Q14155,Q96QB1,Q1411 8,P30622,P80192,O75116,Q15811,O60716,O15085,Q92558,P49792,O75962,Q562F6,Q96PY5 .Q5JSP0,P49454,O96013,Q52LW3,Q9P286,P49137,Q96B97,Q13459,Q9Y6N7,Q9C0H5,Q1400 8,Q9H0H5,Q6P4F7,P98172,O14827,P00533,Q9P107,Q15642,Q13233,B2RTY4,A1A4S6 P08134,Q96P48,Q07889,P98174,Q96PE2,Q15311,Q14155,Q96QB1,O75116,Q15811,O15085, Q6P5Z2,O75962,Q96PY5,Q5JSP0,P30307,Q52LW3,Q13459,Q9C0H5,Q9H0H5,Q6P4F7,O148 27,Q9P107,Q15642,Q15058,B2RTY4,A1A4S6 Q9HBH0,Q96P48,Q07889,P98174,Q96PE2,Q15311,Q14155,Q96QB1,Q15811,O15085,O7596 2,Q5JSP0,Q52LW3,Q13459,Q9C0H5,Q9H0H5,Q6P4F7,O14827,Q9P107,Q15642,B2RTY4,A1A 4S6 P55854,P04637,P35226,Q9P0U3,P35658,Q9UGN5,Q16531,Q96HI0,P49792,Q14676,A6NKT7 .Q86WJ1,P49790,Q9HC52,Q9NRG9,Q9BXT1,Q7Z3J3,P11388,Q8N1F7	4.49E-07	0.00216272	Acetylation;0.0,Cell cycle;0.0,Centromere;0.0,Chrom atin regulator
	9.76E-07	0.00313613	ATP-binding;0.0,Cell cycle;0.0,Cell division;0.0
	1.25E-05	0.01208577	Cytoplasm;0.0,GTPase activation;0.0,Guanine- nucleotide releasing factor;0.0, GTPase activation;0.0,Guanine- nucleotide releasing
	2.48E-05	0.01252429	factor;0.0,SH3 domain;0.0 DNA damage;0.0,DNA repair;0.0,Isopeptide bond;0.0
	3.84E-05	0.01491529	

まとめ

本研究により、がん組織では、生理的重要性の高いリン酸化モチーフに変異が蓄積しやすいことが明らかになった。この結果は、リン酸化モチーフ上の変異は、ゲノム不安定性によるランダムな変異の挿入でなく自然選択的に挿入されていることを示唆する。がん組織特異的な遺伝子変異情報に、我々のもつリン酸化モチーフデータを組み合わせた本研究は、皮膚がんにおける特定シグナル伝達経路への変異の集中を浮かび上がらせることに成功した。本解析手法は、機能未知のリン酸化サイトへの遺伝子変異における、がん化への影響予測につなげることが期待でき、今後、別プロジェクトで行ったがん化オルガノイドのオミクス解析^{8,9}の結果等と組み合わせたクロス解析を行い、非遺伝毒性発がん物質の細胞がん化への影響予測の開発につなげていく予定である。

参考文献

- 1 Wolf, D. C. *et al.* Chemical carcinogenicity revisited 1: A unified theory of carcinogenicity based on contemporary knowledge. *Regul Toxicol Pharmacol* **103**, 86-92, doi:10.1016/j.yrtph.2019.01.021 (2019).
- 2 Bhagat, J. Combinations of genotoxic tests for the evaluation of group 1 IARC carcinogens. *Journal of applied toxicology : JAT* **38**, 81-99, doi:10.1002/jat.3496 (2018).
- 3 Miller, C. T. *et al.* Increased C-CRK proto-oncogene expression is associated with an aggressive phenotype in lung adenocarcinomas. *Oncogene* **22**, 7950-7957, doi:10.1038/sj.onc.1206529 (2003).
- 4 Gerlinger, M. *et al.* Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nature genetics* **46**, 225-233, doi:10.1038/ng.2891 (2014).
- 5 Landry, C. R., Levy, E. D. & Michnick, S. W. Weak functional constraints on phosphoproteomes. *Trends in genetics : TIG* **25**, 193-197, doi:10.1016/j.tig.2009.03.003 (2009).
- 6 Yoshizaki, H. & Okuda, S. Elucidation of the evolutionary expansion of phosphorylation signaling networks using comparative phosphomotif analysis. *BMC genomics* **15**, 546, doi:10.1186/1471-2164-15-546 (2014).
- 7 Yoshizaki, H. & Okuda, S. Large-scale analysis of the evolutionary histories of phosphorylation motifs in the human genome. *GigaScience* **4**, 21, doi:10.1186/s13742-015-0057-6 (2015).

- 8 Yoshizaki, H., Kuwajima, Y., Minato, H. & Kiyokawa, E. Regulation of Ripply1 expression in MDCK organoids. *Biochemical and biophysical research communications* **468**, 337-342, doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.099 (2015).
- 9 Yoshizaki, H., Ogiso, H., Okazaki, T. & Kiyokawa, E. Comparative lipid analysis in the normal and cancerous organoids of MDCK cells. *Journal of biochemistry*, doi:10.1093/jb/mvw001 (2016).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 吉崎尚良, 公共リン酸化プロテオームデータベースのがん研究への応用, 第 4 回質量分析インフォマティクス研究会ワークショップ (東京都, 2019) (招待講演)
- (2) 吉崎尚良, 奥田修二郎, 河野美幸, ヒゲゲノム上にコードされたリン酸化モチーフ上に分布するがん特異的 SNV の解析, 第 41 回日本分子生物学会年会(横浜市, 2018)
- (3) Yoshizaki H, Ling Y, Okuda S, Kohno M, Genome-Wide Analysis of Single Nucleotide Variants on Phosphorylation Motifs, Experimental Biology 2018 (San Diego California, 2018)
- (4) Okuda S, Ling Y, Yoshizaki H, Proteome-wide human phosphomotif analysis, The 24th annual meeting of Intelligent Systems for Molecular Biology (Orlando, Florida, 2016)
- (5) 吉崎尚良, 奥田修二郎, 河野美幸, ヒトゲノム上のリン酸化モチーフ解析, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015) (神戸市, 2015)
- (6) 吉崎尚良, 比較ゲノム解析による、リン酸化シグナルネットワークの同定と意義の解明 ~ 発がんシグナル探索へむけて~, 第 42 回日本毒性学会年会(金沢市, 2015) (招待講演)
- (7) Okuda S and Yoshizaki H, Evolutionary histories of phospho-motifs in the human genome, The 23rd annual meeting of Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) and 14th European Conference on Computational Biology (ECCB) (Ireland, Dublin, 2015)