

令和元年6月12日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17837

研究課題名（和文）遺伝子変異によるタンパク質立体構造の動態変化検出手法の開発

研究課題名（英文）Detection of differences in protein dynamics caused by genomic variant

研究代表者

鎌田 真由美（Kamada, Mayumi）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70749077

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ゲノム解析技術の発展により、数多くの遺伝子変異が報告されるようになった。各遺伝子変異による疾患や薬剤感受性への影響を知るには、タンパク質立体構造での変化を知る必要がある。本研究では、薬剤感受性に影響を与える遺伝子変異によるタンパク質立体構造の動的挙動変化を検出し、変化に関連する構成原子領域を特定する手法の開発を行った。変異と薬剤耐性の関連が多く研究されているタンパク質（EGFR）を対象に手法の検証を行い、その有用性について確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々人の遺伝的背景の違いに基づき適切な診断・治療・予防を行う「ゲノム医療」が、実臨床において実施され始めた。ゲノム医療において重要となるのは、ゲノム解析の結果得られるバリエーション（ゲノムの違い、多様体）に対する、薬剤感受性への影響などを含めた臨床的な意義付けである。膨大な数のバリエーションが報告されている一方で、臨床的意義付けが困難なバリエーション、つまり治療方針決定に役立つことのできないバリエーションも多く存在する。本研究で開発した手法は、バリエーションによる薬剤感受性の影響を、タンパク質立体構造の動的挙動から解釈するためのものであり、機序不明なバリエーションのメカニズム解明への寄与が期待されるものである。

研究成果の概要（英文）：The numerous genomic variants have been reported with the improvement of genome sequencing technology, whereas many of the detected variants are unclear in relation to mechanism of disease and drug efficiency. In order to know the influence of each genomic variant on disease and drug efficacy, it is necessary to understand the change in the three-dimensional structure of the protein. In this study, I worked on the development of a method to detect the dynamic change of protein structure caused by genomic variant that affects drug sensitivity, and to identify the constituent amino acids related to the change. The method has been validated using EGFR (epidermal growth factor receptor), for which the association between variant and drug resistance has been confirmed, and its usefulness was confirmed.

研究分野：バイオインフォマティクス，メディカルインフォマティクス

キーワード：タンパク質立体構造ダイナミクス 時系列解析 ゲノム医療 ゲノムバリエーション

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

1. 研究開始当初の背景

個々人のゲノムの変異・多型(バリエーション)に基づき適切な治療法及び診断・予防を行う「ゲノム医療」が、臨床の現場でも実施され始めた。特にがんでは、過剰発現やドライバー変異を有する特定の標的タンパク質に対する薬剤(分子標的薬)が数多く開発されており、体細胞変異の有無による最適な薬剤選択が可能であると期待されている。ゲノム医療では、ゲノム解析で得られるバリエーションに対して、これまでに明らかになっている遺伝子構造や分子機能などの情報を付与し、臨床的な解釈付けにより治療方針決定を行う。次世代シーケンサーなどを用いて、膨大な数のバリエーション情報が生み出されるようになってきている一方で、その多くが未だ機序不明なバリエーション(Variant of uncertain significance)である。それらのバリエーションが、疾患原因の同定や臨床における薬剤選択を困難にする要因となっている。ゲノムバリエーションによる機能や薬剤感受性への影響を知るには、タンパク質への影響を知る必要がある。特に、タンパク質立体構造の動的挙動(ダイナミクス)が、機能や薬剤などの低分子化合物との親和性に重要な役割を示すことから、バリエーションによるダイナミクスの動態変化の検出、また関与する原子の詳細な挙動についての検証は、薬剤選択や創薬現場において重要な課題となっている。

2. 研究の目的

タンパク質立体構造のダイナミクスを検証するには、分子動力学(Molecular Dynamics, MD)シミュレーションが有効である。これまでに、MDシミュレーションを用いてバリエーションによるタンパク質への影響(機能にとって有害かどうか)を検証する論文がいくつか報告されている。しかし、平均的な構造安定性に関する議論に終始しているものがほとんどである。また、機械学習などを用い、変異体と正常体との動的な差異および差異に関与するアミノ酸残基について定量的に検証する手法も開発されているが、時系列的要素の扱いがされていないという課題があった。そこで本研究では、MDシミュレーションで得られる時系列データから、バリエーションによるタンパク質立体構造ダイナミクスの動的な変化、そして変化に関与する原子領域の検出手法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

タンパク質立体構造のダイナミクスは、ヘリックスやストランドのような構造単位の大きな動きから、1原子における微小な動きまでが、複雑に重なり合った“時空間階層性”を持っている。そこで本研究では、時間軸を残したまま経時的な動きの特徴を捉えることが可能である、時間-周波数解析の一手法であるウェーブレット変換を用いる。ウェーブレット変換では、大きな動きに相当する低周波帯の情報から、微小な動きに相当する高周波帯の情報までを、同時に取得することが可能である。

今回対象とする変異体と正常体との動的挙動の変化は、ダイナミクスを表現する時系列データにおける異常(正常と異なるパターン)検出と捉えることができる。そこで、ウェーブレット変換を用いた時系列の異常検出フレームワークを拡張し、動的挙動の変化の検出を行う。また、タンパク質立体構造は多自由度からなるため、ウェーブレット変換の結果に対して、特異値分解(Singular value decomposition)を用い、タンパク質を構成する原子の振動方向に関する特徴量を作成する。作成した特徴量により表現される時系列に対し、定量的な比較検討を行うため、時系列間の類似度を評価するDynamic Time Warping (DTW)を適用する。ウェーブレット変換には、PyCWTライブラリを、DWTの解析にはPyWaveletsライブラリを用いる。

解析に用いる時系列は、MDシミュレーションを用いて取得する。本研究では、Gromacs 4.6.5による全原子シミュレーションを国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータを用いて実施した。シミュレーションに用いるタンパク質立体構造のデータは、Protein Data Bankより取得する。構造データに欠損領域が存在する場合、SWISS-MODELを用いたホモロジーモデリングにより、補完を行う。

4. 研究成果

本研究ではまず、解析対象の選定と時系列データの作成及び検証を行った。薬剤耐性について生化学的実験においても多くの研究報告があるEGFR(epidermal growth factor receptor)に着目し、第1世代EGFR阻害剤であるGefitinib(イレッサ)に対する薬剤感受性が実験的に検証およびキナーゼドメインの立体構造決定されている2変異体(薬剤奏功変異L858R, 耐性変異G719S)と野生型を解析対象として選定した。

そして、ホモロジーモデリングを用いて欠損領域が補完された各構造に対し、50nsのMDシミュレーションを実施した。シミュレーションの結果得られたデータが、既報通りの薬剤耐性を再現できているのかを確認するために、MM-PB/SA(Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann/Surface Area)法を用いて薬剤とタンパク質との結合自由エネルギーを算出し、データの妥当性について検証した。

次に、シミュレーションで得られた2変異体と野生型の時系列データから200psごとにトラジェクトリを抽出し、Morlet waveletを用いた連続ウェーブレット変換を適用した。今回対象とする薬剤耐性変化に関連する動きのスケールと一致するよう周波数スケール範囲の策定を行い、200ps~20nsの動きに相当する周波数スケールを抽出した。さらに、特異値分解により、タンパク質を構成する原子の振動方向に関する特徴量を作成した。抽出した特徴量(左特異ベクトル)を用いてタンパク質と薬剤分子との協調した動きを評価するための指標を作成した。作成した指標を用い、2変異体と野生体に対して、薬剤が結合するポケット構成アミノ酸残基と薬剤との協調性の経時的変化の評価を行った。評価の結果、変異体間及び野生体で薬剤と協調的に動くアミノ酸残基に違いが検出された(図1)。

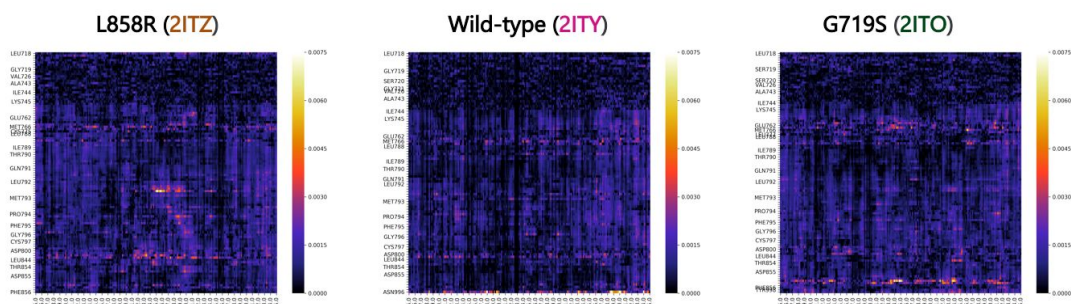


図1. アミノ酸残基の動きの協調性を評価する指標の経時的変化の比較

また、時系列間の類似度を評価する Dynamic Time Warping (DTW)を適用し、変異体及び野生体での時系列の違いを評価した。評価の結果、既知の変異体間の関係性を示すには、DTWへ与える時系列の特徴量作成方法に課題が見られた。しかし指標の作成方法の改良により、より有効な比較検証が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。