

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19403

研究課題名(和文)ゲノム変異集積領域に着目したがん特異的タンパク質間相互作用解析

研究課題名(英文)Protein-protein interaction analysis focusing on mutational hotspots in cancer genome

研究代表者

樋野 展正(Hino, Nobumasa)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：90469916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん変異に影響される蛋白質間相互作用の戦略的な同定手法の確立を目指した。まず、がんゲノム変異と蛋白質立体構造データを組み合わせ、KEAP1蛋白質表面に変異クラスターを特定した。次に、この領域に結合する因子を独自の細胞内光クロスリンク法により解析し、Rab8aを同定した。さらに、KEAP1はRab8aの抑制を介してMT1-MMPの輸送を阻害すること、また、KEAP1のがん変異によりRab8aとの相互作用が破壊され、MT1-MMPが解放される結果、細胞遊走能が亢進する可能性を示した。これらの結果は、変異クラスターに着目すればがん変異に影響される蛋白質間相互作用が同定できることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのがんゲノム創薬研究は既知のがん遺伝子変異をターゲットにしたものがほとんどであり、新規創薬標的の枯渇が問題視されている現状を鑑みると、その研究の方向性を大きくシフトする必要がある。本研究は、これまでほとんど利用されてこなかった低頻度変異情報から新たな創薬標的を見出す戦略を確立することを目指し、実際に、がん変異により異常をきたす新たなタンパク質間相互作用を発見することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish a strategy for identifying protein-protein interactions affected by cancer mutations. By combining datasets of cancer genome mutation and 3D protein structure, we identified structural mutations cluster on the protein surface of KEAP1. We analyzed proteins binding to this surface by in vivo site-specific photo-cross-linking approach and identified Rab8a. Rab8a contributes to cell migration through the recruitment of MT1-MMP to the plasma membrane. Actually, Rab8a gene knockdown reduced cell migration activity, while additional KEAP1 knockdown cancelled this effect, suggesting that KEAP1 negatively regulates Rab8a activity. Furthermore, KEAP1 blocked MT1-MMP transport by tethering Rab8a in the perinuclear region, and the KEAP1 mutation disrupted its interaction with Rab8a, releasing the Rab8a-MT1-MMP complex. These results indicate that the focused analysis on structural mutations cluster can identify protein-protein interactions affected by cancer mutations.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：がんゲノム 遺伝子変異 タンパク質立体構造 タンパク質間相互作用 光クロスリンク 人工アミノ酸 KEAP1

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

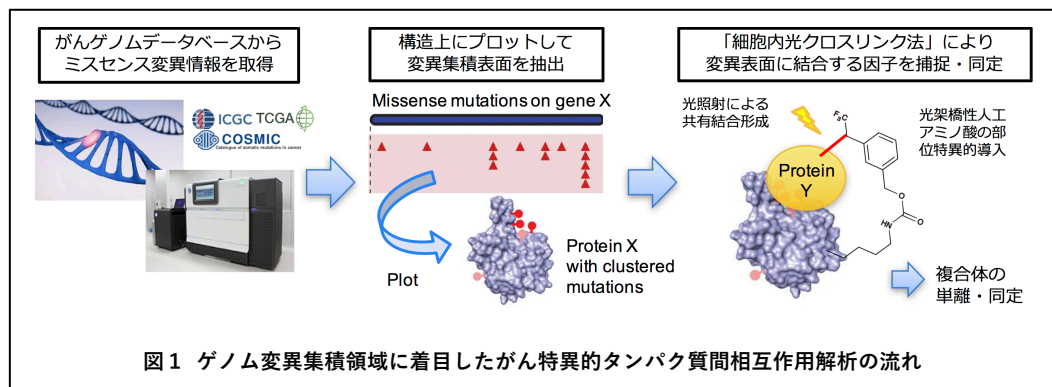
1. 研究開始当初の背景

国際的がんゲノム研究の成果として、がん種ごとの特徴的な遺伝子変異パターンが見出され、がん患者のカテゴリ化や個別化医療へと応用されている。しかしながら、がん関連遺伝子の高頻度変異に特化した解析は新規創薬標的の枯渇という負の側面を招いた。一方で、がんゲノム変異の大部分の変異情報はほとんど利用されておらず、これらの中～低頻度の変異情報から新たな創薬標的を見出す戦略さえ確立できれば、がんゲノム創薬研究は飛躍的に進歩すると考えられる。

最近になって、がん遺伝子のミスセンス変異(アミノ酸置換を伴う変異)をタンパク質の立体構造上にプロットすると、タンパク質間相互作用のインターフェースとなる部分に集積する傾向にあることがわかって来た。逆に言えば、このような「変異集積領域」に着目した相互作用解析を行うことにより、がんで異常を生じるタンパク質間相互作用を効率よく見出すことができると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、がんゲノム解析から見出される一群のミスセンス変異情報からタンパク質間相互作用に影響を及ぼしうる「変異集積領域」を特定し、さらに、その領域を介して生じる相互作用を細胞内光クロスリンク法という独自手法を用いて集中的に解析する。これにより、これまで研究対象とならなかった中～低頻度の変異情報からがん細胞で異常をきたすタンパク質間相互作用を効率よく見出すためのスキームを確立する(図1)。さらに、同定した異常なタンパク質間相互作用が実際がん細胞の生育や機能に有利に働くかどうかを調べることによって、この解析スキームの有効性・妥当性を検証する。



3. 研究の方法

(1) KEAP1 タンパク質立体構造上の変異集積領域の取得

研究対象とする遺伝子としては、非小細胞肺癌の約30%で変異が見られるKEAP1を選択した。KEAP1遺伝子のがん突然変異部位はThe Cancer Genome Atlas (TCGA)の公開データベースであるcBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>)から取得した。KEAP1タンパク質の立体構造情報は日本タンパク質構造データベースPDBj (<https://pdbj.org/>)から取得した(PDB ID: 4N1B)。KEAP1タンパク質立体構造上の変異集積領域は3D hotspots (<https://www.3dhotspots.org/>)を利用して取得した。

(2) KEAP1 がん変異集積領域に結合する因子の細胞内光クロスリンク法による同定

既に開発したタンパク質への人工アミノ酸の部位特異的導入方法(Hino N. et al. *Nat. Methods* 2005, Kita A. et al. *Sci. Rep.* 2016)に基づき、KEAP1のがん変異領域近傍に光クロスリンカーとして機能する人工アミノ酸mTmdZLysを導入した変異体を複数作製した。これらを293c18細胞に発現させた後、細胞への光照射により、細胞内で相互作用している因子とクロスリンクさせた。クロスリンク複合体をアフィニティ法により精製し、その構成成分を質量分析法により同定した。この操作によりKEAP1変異集積領域に結合する因子としてどのような機能を持つものが濃縮されているのかについて、DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)を用いたEnrichment解析により調べた。

(3) 新規GTPase-KEAP1間相互作用のがん変異による影響

KEAP1の変異集積領域を構成する変異群を個別に導入したKEAP1変異体を計7種類作製し、それぞれの変異が上記手法により同定したGTPaseとの結合親和性に与える影響をプルダウンアッセイにより解析した。

(4) KEAP1によるRab8a活性抑制機構の解析

Rab8aを野生型KEAP1もしくは変異型KEAP1とともにHeLa細胞に発現させ、Rab8aおよびそのエフェクターMT1-MMPの局在変化を蛍光免疫染色法により解析した。

4. 研究成果

(1) KEAP1 タンパク質立体構造上の変異集積領域の取得

本研究では、非小細胞肺がんの 30% で変異が見られる KEAP1 遺伝子をモデルとして用いた。まず、がんゲノムデータベース cBioPortal に登録された KEAP1 遺伝子のミスセンス変異部位を既知の立体構造上にプロットしたところ、Kelch ドメインと呼ばれる基質結合ドメイン中に変異が集積する領域が見出された (図 2 A)。

(2) KEAP1 がん変異集積領域に結合する因子の細胞内光クロスリンク法による同定

そこで、この領域を介して相互作用する因子を独自の細胞内光クロスリンク法を用いて同定することを試みた。この手法は、細胞内に光クロスリンカーとして機能する人工アミノ酸を部位特異的に組み込んだ任意のタンパク質を発現させておき、細胞への光照射によってそのタンパク質と細胞内でダイレクトに結合する因子を捕捉・同定する手法である。上記で見出した KEAP1 の変異集積領域は既知相互作用因子である NRF2 の結合部位と重複していた。そこで、この領域近傍の残基を光架橋性人工アミノ酸 mTmdZLys に置換することにより、細胞内で相互作用する NRF2 をクロスリンクにより捕捉できるかを調べた (図 2 B)。その結果、R459、Q528 のそれぞれの残基を mTmdZLys に置換した場合に NRF2 とのクロスリンク産物が検出された (図 2 C)。

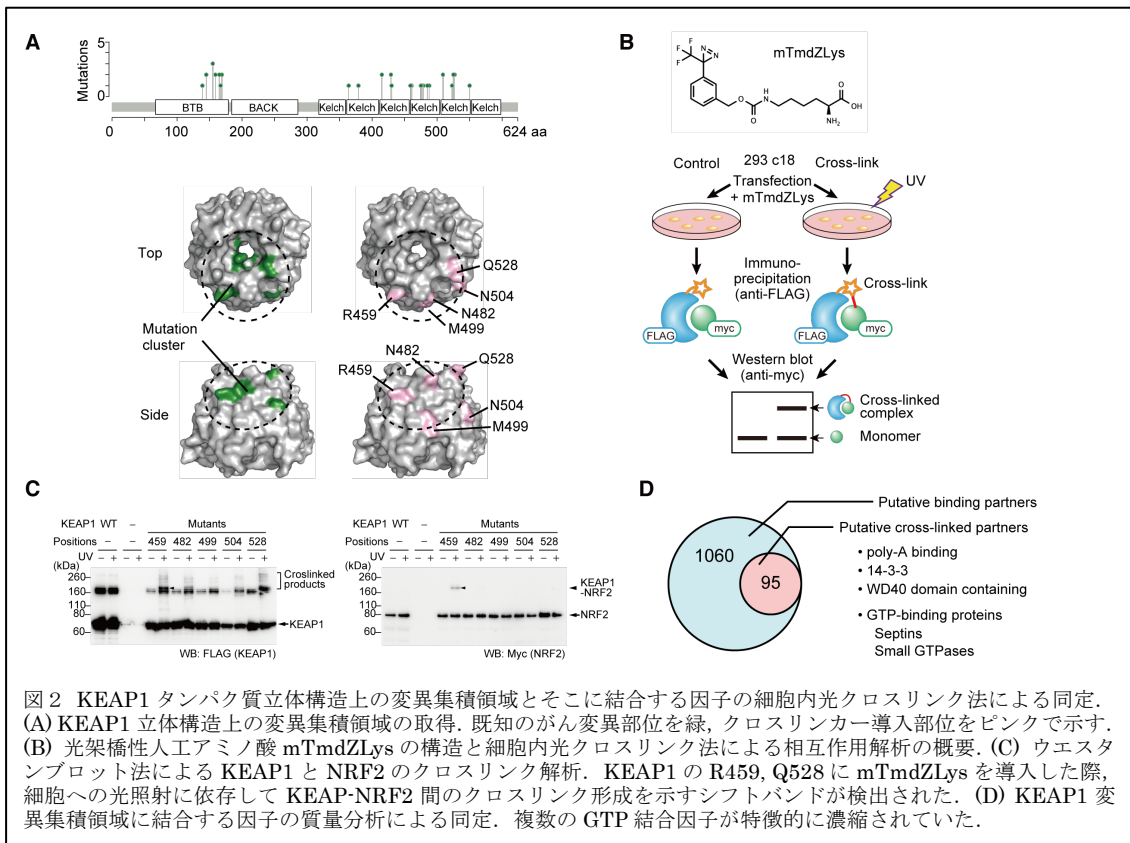
続いて、KEAP1 とクロスリンクした内在性のタンパク質について質量分析法により同定した。その結果、光照射依存的に検出された 95 の KEAP1 結合因子のうち、RAB8a を含む複数の GTPase を KEAP1 の新規相互作用因子として同定することに成功した (図 2 D)。

(3) 新規 GTPase-KEAP1 間相互作用のがん変異による影響

次に、KEAP1 のがん突然変異が Rab8a との結合にどのような影響を及ぼすのかをプルダウンアッセイにより調べたところ、KEAP1 変異集積領域を構成する変異のうちの一つが Rab8a との結合を顕著に阻害することがわかった。以上より、変異集積領域に着目した解析からがん変異に影響される新規タンパク質間相互作用を見出すという当初の目的は達成された。

(4) KEAP1 による Rab8a 活性抑制機構の解析

最後に、両者の機能的関連性について解析を進めた。RAB8a は小胞輸送に関わるタンパク質であり、メタロプロテアーゼ MT1-MMP を細胞辺縁へと輸送することでがんの遊走・浸潤に寄与することが知られている。まず、Transwell assay を用いて HeLa 細胞の遊走・浸潤過程における両者の寄与を調べたところ、KEAP1 の機能破壊により細胞の遊走・浸潤能が亢進し、その効果は RAB8a の機能破壊によりキャンセルされた。さらに、免疫染色法を用いた解析から、内在性の KEAP1 と RAB8a が共局在すること、また、RAB8a 過剰発現時に観察される MT1-MMP の細胞辺縁への移動が KEAP1 過剰発現により抑制される一方、KEAP1 がん変異体ではその効果が失われることを示した。これらのことから、KEAP1 は RAB8a による MT1-MMP の輸送を制限することでがん細胞の遊走・浸潤を抑制する可能性が示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shirakura Keisuke, Ishiba Ryosuke, Kashio Taito, Funatsu Risa, Tanaka Toru, Fukada So-ichiro, Ishimoto Kenji, Hino Nobumasa, Kondoh Masuo, Ago Yukio, Fujio Yasushi, Yano Kiichiro, Doi Takefumi, Aird William C., Okada Yoshiaki	4. 巻 132
2. 論文標題 The Robo4-TRAF7 complex suppresses endothelial hyperpermeability in inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs220228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.220228	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Okuno Hiroko, Okuzono Haruna, Hayase Ayaka, Kumagai Fumiko, Tanii Shohei, Hino Nobumasa, Okada Yoshiaki, Tachibana Keisuke, Doi Takefumi, Ishimoto Kenji	4. 巻 509
2. 論文標題 Lipin-1 is a novel substrate of protein phosphatase PGAM5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 886 ~ 891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.01.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noguchi Yu-taro, Nakamura Miki, Hino Nobumasa, Nogami Jumpei, Tsuji Sayaka, Sato Takahiko, Zhang Lidan, Tsujikawa Kazutake, Tanaka Toru, Izawa Kohei, Okada Yoshiaki, Doi Takefumi, Kokubo Hiroki, Harada Akihito, Uezumi Akiyoshi, Gessler Manfred, Ohkawa Yasuyuki, Fukada So-ichiro	4. 巻 146
2. 論文標題 Cell-autonomous and redundant roles of Hey1 and HeyL in muscle stem cells: HeyL requires Hes1 to bind diverse DNA sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev163618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.163618	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yanagisawa Tatsuo, Kuratani Mitsuo, Seki Eiko, Hino Nobumasa, Sakamoto Kensaku, Yokoyama Shigeyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Structural Basis for Genetic-Code Expansion with Bulky Lysine Derivatives by an Engineered Pyrrolysyl-tRNA Synthetase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 936 ~ 949.e13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2019.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 樋野展正
2. 発表標題 細胞内光クロスリンク法を用いたがん変異に影響されるタンパク質間相互作用の同定
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋野展正, 向山樹, 鳴海良平, 川端猛, 山本紘義, 重松知沙, 山本真実, 栗栖 源嗣, 足立淳, 土井健史
2. 発表標題 変異集積表面への光クロスリンカー導入によるがん特異的蛋白質間相互作用の同定
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本紘義, 向山樹, 鳴海良平, 重松知沙, 山本真実, 足立淳, 土井健史, 樋野展正
2. 発表標題 細胞内光クロスリンク法を利用した新規肺がん治療標的の探索
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和島壮一, 喜多絢海, 谷口健吾, Jeremia Febrian, 齋藤里緒, 高島成二, 土井健史, 樋野展正
2. 発表標題 細胞内光クロスリンク法によるDNA脱メチル化酵素TET1の活性調節因子の探索
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jeremia Febrian, 喜多絢海, 谷口健悟, 和島壮一, 斎藤里緒, 高島成二, 土井健史, 樋野展正
2. 発表標題 DNA脱メチル化関連酵素TET1の活性調節機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向山樹, 廣田康二, 鳴海良平, 山本紘義, 重松知沙, 山本真実, 足立淳, 土井健史, 樋野展正
2. 発表標題 細胞内光クロスリンク法を用いたがん特異的タンパク質間相互作用の効率的な解析系の確立
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野ホームページ https://seimeijohokaiseki.wixsite.com/tanpaku</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考