

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770190

研究課題名(和文)リン酸化モチーフの比較進化解析から細胞機能とモチーフの関係を明らかにする

研究課題名(英文)Comparative phospho-motif analysis reveals the evolutionary expansion of phosphorylation signaling networks

研究代表者

吉崎 尚良 (YOSHIZAKI, Hisayoshi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：00443490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質リン酸化はあらゆる生命現象の調節に働くが、ほとんどのリン酸化サイトの生理的意義はまだ知られていない。我々は、本課題で生理的に重要なリン酸化サイトの抽出法を開発した。既知リン酸化サイトから178のリン酸化モチーフを決定し、その比較進化解析を行うことで、特定の種から保存性が急増する16モチーフを発見した。16モチーフの解析で、線虫からキナーゼの、ショウジョウバエからZincFingerタンパク質の、ゼブラフィッシュからスプライシング、細胞骨格およびインスリンシグナルのリン酸化調節が付加されたことが分かった。この結果は、本解析で進化的に付加された重要な調節回路を同定できることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Protein phosphorylation is a post-translational modification that is essential for a wide range of eukaryotic physiological processes. However the physiological roles of most remain unknown. In this study, we developed a method to extract phosphosites with important roles in cellular functions.

We determined 178 phosphomotifs based on the analysis of 34,366 phosphosites. Comparative genomic analyses were performed using genomes from nine species from yeast to humans. Consequently, we identified 16 phosphomotifs, in which the level of conservation increased among species. The highly conserved phosphomotifs in humans and the worm were kinase regulatory sites. The motifs that appeared in the fly were novel phosphomotifs, including zinc finger motifs. The motifs that appeared in fish allowed the detection of the expansion of phosphorylation signaling related to alternative splicing.

Our method can be helpful for extracting novel phosphomotifs with physiological functions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リン酸化 シグナル伝達 比較進化解析 モチーフ解析

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化は、キナーゼにより触媒される修飾で、細胞内シグナル伝達経路の調節を介して、さまざまな生命現象で重要な役割を担っている。キナーゼはリン酸化する基質周辺配列に特異性がみられるものも多く、これらはリン酸化モチーフとして解析が進められている<sup>1</sup>。タンパク質リン酸化の解析は、リン酸化プロテオミクス解析の開発により大規模に進められるようになり<sup>2</sup>、これまで同定されたリン酸化サイトの数は、約 20 万サイトに上る。日々増大するリン酸化情報はデータベース化され、他のデータベース情報と組み合わせ、さまざまなアルゴリズムを使い生命現象につながる機能やシグナル伝達経路を予測するバイオインフォマティクス解析を盛んにした<sup>3</sup>。リン酸化シグナルの理解には、リン酸化サイトの情報だけでなく、リン酸化する酵素、また基質タンパク質のリン酸化が、その機能にどのような影響をもつか知る必要がある。しかし膨大なリン酸化サイトの情報に対し、その生理機能やキナーゼ - 基質の情報などは、非常に少ない。

## 2. 研究の目的

生物はゲノム情報の組み換え、改変を介したシグナルネットワークの進化によりその機能の多様化を獲得してきた。リン酸化シグナルのネットワークも同様で、その比較進化解析は、生理機能に直結したリン酸化シグナルを抽出する強力なツールとなる<sup>4</sup>。これまでの、比較進化解析は、単純にゲノム上で保存性の高い核酸やアミノ酸配列の抽出する方法がとられてきた<sup>5</sup>。しかしながら、この方法では保存性が高い生命機能に必須なコアシグナルは抽出できるが、進化の途中で獲得された重要なシグナルは発見することができなかった。本課題で我々は、複雑なリン酸化シグナルを単純化するために、膨大なリン酸化サイトを、より少ないリン酸化モチーフにまとめた。そして、抽出したリン酸化モチーフの比較進化解析を行うことで、特定の進化段階から突然出現するモチーフの抽出を試みた。このようなモチーフは、進化の過程で追加されたシグナルモジュールであることが期待される。それぞれのモチーフと生理機能は相関を調べ、リン酸化モチーフの比較進化解析がシグナル伝達経路研究において、シグナルの整理と理解に有効であることを示し、新たな生命現象の制御機構の発見にも有効であることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) リン酸化モチーフの決定

PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org/>),

PhosphoELM (<http://phospho.elm.eu.org/>) から 97679 の既知リン酸化サイトを抽出しリン酸化サイトの前後 5 アミノ酸をアミノ酸の類似性で MCL クラスタリング解析した。得られた 474 のクラスターは WebLOGO (<http://weblogo.berkeley.edu/>) を使い視覚化し、bit 数を指標に有意なアミノ酸配列を含むクラスターを選択分類することでリン酸化モチーフを決定した。

### (2) 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。

### (3) GO エンリッチメント解析

Gene Ontology エンリッチメント解析は GoMiner (<http://discover.nci.nih.gov/>) を使い、cutoff 値は FDR=0.01 と p 値<0.01 とした。

### (4) ネットワーク解析

ヒトから分裂酵母まで保存されているリン酸化モチーフを持つ 585 のタンパク質で構成されるネットワークをコアネットワークとし、その 585 のタンパク質に相互作用する 996 タンパク質を含むネットワークをアディショナルネットワークと定義した。タンパク質間の相互作用は、BioGRID (<http://thebiogrid.org/>) と STRING (<http://string-db.org/>) のデータを使用した。

## 4. 研究成果

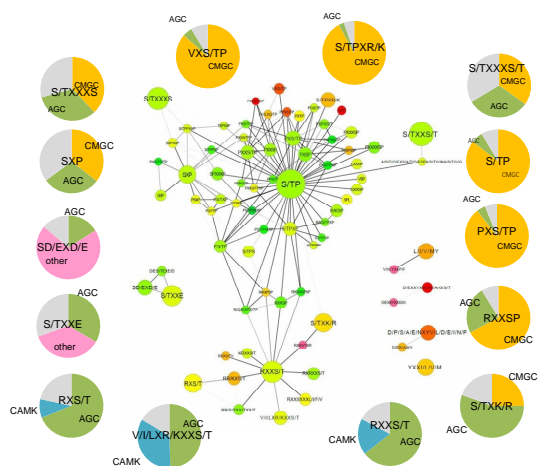
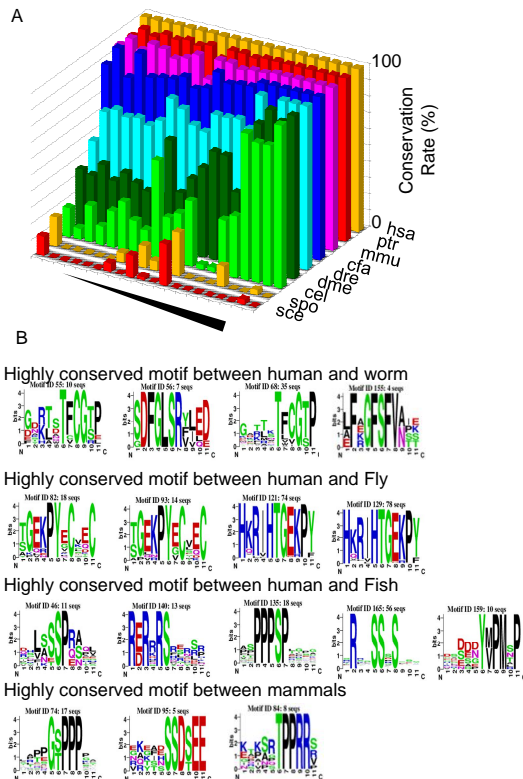


図1 同定したリン酸化モチーフモチーフのアミノ酸の類似性でネットワークを形成、PhosphoSitePlus のデータからモチーフをリン酸化するキナーゼの種類と割合を円グラフで示した。

### (1) リン酸化モチーフの決定

前述した3(1)の方法で178のリン酸化モチーフを決定した。次にPhosphoSitePlusから既知キナーゼ-基質間情報を入力し、各リン酸化モチーフを持つサイトがどのようなキナーゼによってリン酸化されているか調べた。この結果、モチーフ内に配置されるアミノ酸の性質により、リン酸化するキナーゼは限定されることが確認された(図1)<sup>6</sup>。

### (2) リン酸化モチーフの比較進化解析



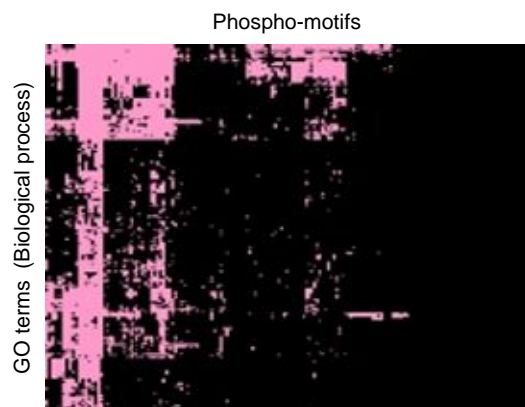
**図2 リン酸化モチーフの比較進化解**  
A リン酸化モチーフの進化的保存性をCIとし、CIの高い順に進化的保存性のグラフを並べた。B 特定の種から保存性が増加するシグモイド型進化保存性を示すリン酸化モチーフ

リン酸化モチーフを構成するリン酸化サイトがどの種まで保存されているか比較ゲノム解析により調べた。(図2A)。リン酸化サイトの保存性のグラフは、ヒトから酵母にかけて、直線的に減少するものと、特定の種で大きく減少するシグモイド型に分類された。シグモイド型のモチーフは、保存性が増加した種以降で生命の維持に必須であることが示唆され、かつその種とその前の種の機能の差に由来することが期待された。我々は、シグモイド型の変化を示すモチーフの抽出を特定の種で50%以上の保存性の変化を持つモチーフと定義し、シグモイド型の進化パターンを持つモチーフを探索した。この結果、線虫のポイントから増加するモチーフとして

motif 55, motif-56, motif-68の3モチーフ、ショウジョウバエから増加するモチーフとして、motif-82, 93, 121, 129, 163の5モチーフ、ゼブラフィッシュから増加するモチーフとして motif-116, 159, 53, 79の4モチーフを同定した(図2B)<sup>6</sup>。

### (3) GO エンリッチメント解析

比較進化解析により、抽出された motif は、どれも特徴的なシグモイドカーブを描いた。このような進化圧がかかっている motif は、重要な生命機能に直結していることが期待された。そこで、抽出した motif を持つタンパク質がどのような機能を持つか調べるため、リン酸化 motif を構成するリン酸化タンパク質群の Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を行い、リン酸化 motif が、どのような生理機能に関連付けられているか解析した(図3)。その結果、線虫から増加する3 motif はすべて phosphorylationに関連するタンパク質を優位に含んだ。中でも motif-56 は development and differentiation に関係するタンパク質に多くコードされており、motif-68 は cell death, insulin signaling pathway との相関を示唆した。ショウジョウバエから増加する motif は4 motif とともに transcription, RNA metabolic process に関連付けられたタンパク質にコードされた motif であった。ゼブラフィッシュから増加する motif は、motif-159 は cell migration, transmembrane, insulin secretion に関係するタンパク質に含まれることが示唆された。motif-140 は RNA processing, RNA splicing との相関が示唆された。



**図3 GO エンリッチメント解析**

### (4) C2H2 モチーフのリン酸化制御はショウジョウバエから大きく展開された

ショウジョウバエからヒトまで保存性の高い motif として Motif 129, 121, 82, 93 が同定された。これらのモチーフをもつタンパク質194分子の性質を Uniprot-KB から、リン酸化される部位のドメイン構造を Pfam で調べたところ、すべてのリン酸化部位が、

Zinc-Finger MotifであるC2H2 motifおよびその周辺に集中していた。C2H2 motifは、システイン(C)二つとヒスチジン(H)二つで亜鉛をキレートする構造を持つ motifで、この motifが複数つながることでDNAに結合する。主に transcription factorに多く存在が確認されており、6000以上のC2H2 motifがヒトゲノム上で確認されている。このヒトからショウジョウバエまで保存されているモチーフは、二つ目のヒスチジン残基の直後にあるスレオニン、最初のシステイン残基の2アミノ酸前方のチロシンがリン酸化されるモチーフであった。Motif121,129でリン酸化されるスレオニンは、C2H2 motifとDNAとの相互作用を調整し細胞周期の調節に機能することが報告されていた。これは、モチーフの比較進化解析が、生理的に意義のあるリン酸化モチーフを抽出するのに有効であることを示している。そこでリン酸化の制御が報告されていない Motif-82の機能について調べた。motif-82のリン酸化がC2H2 motifの機能に関係しているか解析するため、Motif-82、163のリン酸化モチーフを含むC2H2モチーフをタンデムに配置した配列を合成し(2xC2H2)、比較対象として、motif-82のリン酸化サイト(チロシン)をフェニルアラニンに置換した2xC2H2-YFを作製した。それぞれ mVenusと mCFPを融合し Cos細胞内での局在を比較した。その結果、YF mutantの方が wild typeのC2H2 motifに比べ核小体への局在が増加していた<sup>6</sup>。これは、Motif-82のTyrosineがC2H2の局在に影響を持つことを示唆した。

**(5)シグモイドカーブの進化パターンを示すリン酸化モチーフはコアシグナルネットワークに直接相互作用するアディショナルネットワークに存在する。**

**表 1 特定種から増加するリン酸化モチーフのコアネットワークに対する位置関係**

	Fish	Fly	Worm
Proteins	95	58	47
Core network	4	0	1
Random core network	10.5	6.83	5.45
Additional network	28	2	21
Random Additional network	17.18	10.17	8.5
Odds ratio	4.28	3.43	13.47
P value	9.98E-05	0.00378	1.90E-05

(3)のGSEAの結果は、ゼブラフィッシュから保存性が高くなるモチーフは、スプライシング、シグナル伝達、細胞骨格制御関連のタンパク質にコードされていることを示した。これらのプロセスはゼブラフィッシュ

よりも原始的な生物から備わるシグナル経路であることから、ゼブラフィッシュから保存性が増えたモチーフは、古典的なシグナルネットワークの進化的拡張性に関係していることが予想された。そこで我々は、今回同定したシグモイドの進化パターンを持つモチーフが、シグナルの進化的拡張性に関わるか調べた。シグモイドの進化パターンは線虫から観察された。よって酵母まで保存性されたリン酸化サイトをもつタンパク質のネットワークを作成しコアシグナルネットワークとした。さらにコアシグナルネットワークに直接相互作用する分子でつくられたネットワークを、酵母以降に進化的に拡張されたアディショナルネットワークと定義し、シグモイドの進化パターンを持つモチーフがどのネットワークに多く存在するか調べた。その結果、シグモイドの進化パターンを持つモチーフを持つタンパク質は、ショウジョウバエからのモチーフをのぞき、有意にアディショナルネットワークに偏在していた。さらにコアシグナルネットワークへの存在は、優意に低かった(表1)。これらの結果はシグモイド型の進化保存性を持つモチーフは、コアシグナルの進化的拡張性に関与することを示唆した<sup>6</sup>。

#### 引用文献

1. J. A. Ubersax, J. E. Ferrell, Jr., Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 530 (Jul, 2007).
2. F. Gnad, J. Gunawardena, M. Mann, PHOSIDA 2011: the posttranslational modification database. *Nucleic acids research* 39, D253 (Jan, 2011).
3. R. Linding et al., Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks. *Cell* 129, 1415 (Jun 29, 2007).
4. W. A. Lim, T. Pawson, Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. *Cell* 142, 661 (Sep 3, 2010).
5. C. S. Tan et al., Comparative analysis reveals conserved protein phosphorylation networks implicated in multiple diseases. *Science signaling* 2, ra39 (2009).
6. H. Yoshizaki, S. Okuda, Elucidation of the evolutionary expansion of phosphorylation signaling networks using comparative phosphomotif analysis. *BMC genomics* 15, 546 (Jul 1, 2014).

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Yoshizaki H. and Okuda S. Large-scale

analysis of evolutionary histories of phosphorylation motifs in the human genome. *Gigascience*. (査読あり) 4: 21. 2015 doi: 10.1186/s13742-015-0057-6

Yoshizaki H. and Okuda S. Elucidation of the evolutionary expansion of phosphorylation signaling networks using comparative phosphomotif analysis. *BMC Genomics*. (査読あり) 15(1): 546. 2014 doi: 10.1186/1471-2164-15-546

[学会発表](計7件)

Okuda S and Yoshizaki H. Large-scale analysis of the evolutionary history of phosphorylation motifs, The 2014 ASCB / IFCB Annual Meeting, Dec. 6-10 2014, Philadelphia, Pennsylvania, USA

竹林 輝、野田 陽平、吉崎 尚良、向井 秀幸、早野 俊哉、細胞分裂期における PKN の基質の網羅的同定、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

野田 陽平、吉崎 尚良、向井 秀幸、早野 俊哉、PKN シグナル伝達のリン酸化プロテオーム解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

吉崎 尚良、奥田 修二郎、Comparative phospho-motif analysis reveals the evolutionary expansion of phosphorylation signaling networks、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

Okuda S and Yoshizaki H. Characterization of protein phosphorylation in the context of evolution, 22nd Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, Jul. 11-15 2014, Boston USA

野田 陽平、吉崎 尚良、向井 秀幸、早野 俊哉、Proteomic analysis of PKN in the mitotic phase、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド

吉崎 尚良、奥田 修二郎、リン酸化モチーフの比較進化解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド

[その他]  
リン酸化モチーフ解析のデータは GigaDB にて公開した。

Supporting data and materials for "Large-scale analysis of evolutionary histories of phosphorylation motifs in the human genome". *Giga DB* doi: 10.5524/100136

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉崎 尚良 (YOSHIZAKI, Hisayoshi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00443490