

令和 4 年 10 月 15 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06199

研究課題名(和文)GPCR間相互作用変化で説明可能な疾患関連変異の予測

研究課題名(英文) Prediction of disease-associated hotspot mutations that affect GPCR oligomerization

研究代表者

根本 航 (Nemoto, Wataru)

東京電機大学・理工学部・准教授

研究者番号：10455438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前にGPCR間相互作用ペアを予測する手法GPCR-GPCR interaction pair predictor (GGIP)を開発した。本研究では、GGIPを応用し、GPCRへの疾患関連変異のうち、GPCR間相互作用に影響を及ぼし疾患を誘発するものを予測した。ロドプシンの二量体形成を阻害することで網膜色素変性症を引き起こすとされる、ヒトロドプシン変異体(F45L, V209M, F220C)は、いずれも相互作用阻害変異と予測された。同様に、レット症候群との関連が示唆され、GB2とのヘテロダイマー形成を阻害するGB1のA707T変異も、相互作用阻害変異と予測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変異導入前後での予測結果を比較する本研究は、変異が分子機能変化を通して形質変化に至る機構を議論する汎用的手法に拡張可能である。短時間で変異の影響を見積もるため、任意のタンパク質の全残基を変異させ影響を予測するなどの網羅的解析が可能で、蓄積し続ける変異情報の解析基盤に発展する。表現型の個人差を生む遺伝情報の差異の解析と分子機構解明は、医薬開発への貢献が考えられる。サイトカイン・ストームやブラジキニン・ストームに關するGPCRsは、他の膜タンパク質との相互作用、相互作用モチーフ、機能変化が報告されており、COVID-19含むウイルス研究との関連でも興味深い

研究成果の概要(英文)：We have previously developed GGIP, a method to predict GPCR-interaction pairs with high accuracy. In this study, we propose a workflow to predict disease-associated mutations to GPCRs that affect GPCR oligomerizations. The rhodopsin mutants F45L, V209M and F220C, which are known to cause retinitis pigmentosa by inhibiting rhodopsin dimer formation, were predicted to be interaction inhibitive mutations. Similarly, the A707T mutation in GB1, which has been suggested to be associated with Rett syndrome and inhibits heterodimer formation with GB2, was also predicted to be an interaction inhibitive mutation. A same strategy was applied to cancer-causing mutations. The application of the strategy to cancer-causing mutations showed that the number of interaction inhibitive mutations was larger than that of interaction promotive mutations.

研究分野：立体構造インフォマティクス

キーワード：GPCRs タンパク質間相互作用 相互作用ペア予測 疾患関連変異 機械学習

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

依然として重要な創薬標的の一つである GPCR は、GPCR 同士でダイマー以上の高次複合体(オリゴマー)を形成する。オリゴマーの機能は、内在性リガンドへの結合能・共役 G タンパク質・発現量・細胞内輸送などのうち少なくとも一つについて、モノマーの場合とは異なる。オリゴマー形成が疾患・高次機能と関連するため、オリゴマー形成の制御物質は既存の GPCR 標的薬とは作用機序が異なる可能性が高い。

我々は以前に GPCR の立体構造・配列を利用し、サポートベクターマシンによりヘテロダイマー形成ペアを予測する手法(GGIP)を開発した。GGIP は異なる 2 本の GPCR 配列を入力すると相互作用ペアか否かを高精度に判別する(AUC=0.943)。

本研究では、この GGIP を応用し、GPCR 間相互作用異常が関連する疾患関連変異を予測するワークフローの開発に取り組んだ。例えば、発がん関連変異が GPCR に多数報告されている。報告されている変異の大部分の分子機構は未解明である[Nat Rev Cancer. 2013;13:412-24.]. ヘリックス束間に形成されたポケット部位や細胞内ループ、または、それらの領域の近傍における変異は、リガンド結合や三量体 G タンパク質との共役に影響を及ぼすと推測される。しかし、膜貫通領域において脂質二重層と接する領域における変異は、リガンドや G タンパク質との相互作用に直接影響を及ぼしているとは考えにくい。GPCR は細胞膜上でホモまたはヘテロのオリゴマーを形成する。オリゴマー形成には分子表面のアミノ酸が寄与している。分子表面への変異はオリゴマー形成に影響を及ぼす可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、GGIP を利用することで、それらの変異が GPCR 間相互作用に影響を及ぼす可能性を検討する。野生型 GPCR 配列ペアを GGIP に入力した時と、ペアの少なくとも一方に疾患関連変異を導入した時の予測結果を比較し、予測結果が変化した場合、相互作用に影響を及ぼす変異であると判定する。

3. 研究の方法

本研究では、GGIP を用いて、GPCR 間の相互作用に影響を与える疾患原因変異を調べた。予測に野生型 GPCR 配列ペアを用いた場合の予測結果と、いずれかのモノマー配列に疾患関連変異を導入した場合の予測結果を比較した。野生型ペアが相互作用するペアと予測され、変異を含むペアが非相互作用ペアと予測された場合、その変異は相互作用阻害変異とみなした。一方、野生型ペアが非相互作用ペアと予測され、変異を含むペアが相互作用ペアと予測された場合、その変異は相互作用促進変異とみなした。

表 1. 解析対象とした GPCR 遺伝子数、変異サイト数、置換数とそのクラス分類

	Class A	Class B	Class C	Class D	Class E	Class F	Orphan	All
#Genes	103	6	5	0	0	3	0	117
#Mutated sites	2,998	673	439	0	0	97	0	4,207
#ns substitutions	3,222	716	468	0	0	104	0	4,510

4. 研究成果

(1) 予測精度の検証

GPCR 間の相互作用に影響を及ぼす疾患関連の変異を分析した。最初の例は、網膜色素変性症(RP)を引き起こすヒト・ロドプシンの 3 つの変異体である。RP に関連する 3 つのロドプシンの変異、F45L、V209M、F220C は、ブルダウン実験において単量体として振る舞うことが確認されているが、野生型のロドプシンは二量体または多量体としてリボソームに機能的に再構成されることが報告されている。GGIP により、RP に関連する変異体はすべて相互作用阻害変異と予測された。すなわち、野生型ロドプシン配列のペアは、GGIP では相互作用すると予測されたが、3 つの RP 関連変異体は野生型ロドプシンとは相互作用しないと予測された。

2 つ目の例は、レット様症候群(RS)を引き起こすヒト GABA_BR2(GB2)の変異体である。RS に関

連する変異として、ヒト GB2 の A707T がヘテロダイマーの数を減少させることが確認されている。GGIP では、RS に関連する変異体はすべて相互作用阻害変異と予測された。つまり、GGIP により野生型の GB1 と GB2 は相互作用することが予測されたが、RS 関連変異体は野生型の GB2 とは相互作用しないと予測された。

以上より、GGIP を用いることで、GPCR のオリゴマー化に影響を与える疾患関連の 1 アミノ酸変異を予測できることが示された。検証に用いることのできた GPCR ペア数は少ないが、この結果は、GGIP が GPCR のホモダイマーとヘテロダイマーの両方における変異の影響を予測できる可能性を示唆している。

(2) 発がん関連ミスセンス変異の解析

(1)と同様の手順で、GPCR 間相互作用を変化させるがん関連ミスセンス変異を予測した。相互作用予測結果を変化させた変異の数を表 1 に示した。

表 2. 相互作用予測結果を変化させた変異数

変異の種類	変異の数
相互作用阻害変異	204
相互作用促進変異	19

相互作用阻害変異の数は解析対象 GPCR の分子全体で 204 個、相互作用促進変異の数は 19 個であった。1 アミノ酸が変化することにより、新たな相互作用が形成されることよりも、既存の相互作用が阻害されることのほうが多いことが示された。しかし、一方で、1 アミノ酸の変異が新たな相互作用を引き起こす可能性も示唆された。

相互作用阻害変異は分子全体に位置していたが、GPCR 分子のどこに変異が存在するかによってアミノ酸変異の傾向が異なっていた。分子全体を解析対象とすると、最も高頻度な変異は Ser から Arg であった。一方、分子表面のみに着目すると、Gln から Glu が高頻度であった。Ser から Arg への変異は分子の内部に埋もれる傾向にあることがわかった。また、膜貫通領域表面に存在する相互作用阻害変異については、Ala から Asp の頻度が高かった。

相互作用促進変異の多くは分子表面に位置していた。相互作用促進変異の数は分子全体、分子表面、膜貫通領域表面の全てにおいて相互作用阻害変異より少なく、1 アミノ酸置換によって GPCR 間相互作用を促進することは稀である。

表 3. 相互作用阻害変異と相互作用促進変異のクラス分類

変異の種類	クラス A	クラス B	クラス C
相互作用阻害変異	144	41	19
相互作用促進変異	19	0	0

相互作用予測結果を変化させた変異が存在する GPCR のクラス分類を表 2 に示した。クラス A では、相互作用阻害変異が 144、相互作用促進変異が 19 予測された。クラス B、クラス C では、それぞれ 41、19 の相互作用阻害変異が予測されたが、相互作用促進変異は予測されなかった。

クラス A GPCR にて、最も頻度の高かった相互作用阻害変異は Gln から Glu、2 番目は Ala から Asp であった。クラス B とクラス C において、相互作用阻害で最も頻度の高かった変異はどちらも Ser から Arg であった。クラス A の GPCR に存在する相互作用阻害変異は他のクラスとは変異の傾向が異なることが示唆された。また、クラス B とクラス C の GPCR に存在した相互作用阻害変異は同じ傾向であった。

[再提出時に追記した内容]

(3) GPCR 間相互作用予測結果に影響を及ぼすアミノ酸変異の傾向

相互作用に影響を及ぼしたアミノ酸変異を表 4 にまとめた。アミノ酸変異は相互作用予測に影響を及ぼした順に記載している。

表 4 GPCR 間相互作用予測結果に影響を及ぼしたアミノ酸変異

相互作用に影響を及ぼした変異の分類	高頻度で見られたアミノ酸変異
分子全体における相互作用阻害変異	Ser Arg, Gln Glu
分子全体における相互作用促進変異	Arg Gly, Ala Gly
クラス A に存在する相互作用阻害変異の割合	Gln Glu, Ala Asp
クラス B に存在する相互作用阻害変異の割合	Ser Arg
クラス C に存在する相互作用阻害変異の割合	Ser Arg
分子表面に存在する相互作用阻害変異	Gln Glu, Ala Asp, Cys Phe
分子表面に存在する相互作用促進変異	Arg Gly, Ala Gly

膜貫通領域表面に存在する相互作用阻害変異	Ala Asp, Cys Phe, Ser Arg
膜貫通領域表面に存在する相互作用促進変異	Arg Gly, Asp Glu

相互作用阻害変異は GPCR 分子のどこに変異が存在するかによってアミノ酸変異の傾向が異なる(表 4)。分子全体において相互作用阻害に最も影響を与えたアミノ酸変異は Ser から Arg だったが、分子表面に存在する変異は Gln から Glu であった。Ser から Arg への変異は分子の内部に存在していることが示された。また、分子表面に存在する相互作用阻害変異と異なり、膜貫通領域表面に存在する相互作用阻害変異において、Ala から Asp が最も相互作用阻害に影響を与える変異であった。Gln から Glu の変異は膜貫通領域以外、つまり、細胞内外ループや N 末端領域や C 末端領域に存在している傾向にあり、リガンド結合や G タンパク質との共役にも影響している可能性がある。一方、相互作用促進変異について、分子全体に存在する変異と分子表面残基に存在する変異の傾向が同じであったことから、相互作用促進変異の多くは分子表面残基に存在することが示された。また、相互作用阻害変異が存在する GPCR をクラスごとに分類し、変異の傾向にどのような特徴があるかを示した。クラス A の GPCR において、相互作用阻害に最も影響を及ぼした変異は Gln から Glu であった。クラス B とクラス C において、相互作用阻害に最も影響を及ぼした変異はどちらも Ser から Arg であった。このことから、クラス A の GPCR に存在する相互作用阻害変異はクラス B とクラス C の GPCR に存在する相互作用阻害変異と異なる傾向にあること、クラス B とクラス C の GPCR に存在する相互作用阻害変異の傾向は同じであった。

分子全体において最も相互作用阻害に影響を与えた Ser から Arg への変異について、Ser は中性アミノ酸、Arg は塩基性アミノ酸である。Ser から Arg は分子の内部に埋もれていることが示唆されており、疎水性スコアとアミノ酸の性質が変化することによって相互作用インターフェイス内部の立体構造が変化し相互作用を阻害する可能性が示唆された。分子表面において最も相互作用阻害に影響を与えた Gln から Glu への変異について、疎水性度の変化は小さい。しかし、中性アミノ酸から酸性アミノ酸に変化しているため相互作用に少なからず影響している可能性がある。膜貫通領域表面において最も相互作用阻害に影響を与えた Ala から Asp について、Ala は中性アミノ酸、Asp は酸性アミノ酸である。また、2 番目に相互作用阻害に影響を及ぼした Cys から Phe への変異について、疎水性スコアの変化は小さく、アミノ酸の性質も変化はない。しかし、Phe は芳香族アミノ酸であり、芳香環を持たないアミノ酸から芳香環を持つアミノ酸へと変化することによって相互作用阻害に大きく影響を与える可能性が示唆された。一方、相互作用促進変異において最も影響を与えた Arg から Gly への変異について、疎水性スコアの変化は中程度であった。また、相互作用促進に影響を与えた変異の数は分子全体、分子表面、膜貫通領域表面の全てにおいて相互作用阻害変異より少なかった。このことから、1 アミノ酸置換によって GPCR の相互作用を促進することは稀であることが示唆された。GPCR 間相互作用を促進させる可能性の一つとして、膜タンパク質のダイマー形成において GXXXG モチーフが重要であると報告されており、Gly への変異によって GXXXG モチーフが形成されることが挙げられる。

表 5 相互作用に影響を及ぼした変異の位置

図の番号	高頻度で見られたアミノ酸変異
分子全体における相互作用阻害変異	膜貫通領域 7 番目の中央 細胞内ループ 1, 3 細胞外ループ 1, 2, 3 N 末端領域 膜貫通領域 3 番目の中央
分子全体における相互作用促進変異	細胞外ループ 1, 2 膜貫通領域 2 番目の中央 細胞内ループ 3
クラス A の相互作用阻害変異	細胞内ループ 1, 3 細胞外ループ 2, 3 膜貫通領域 3 番目の中央
クラス B の相互作用阻害変異	膜貫通領域 7 番目の中央 膜貫通領域 5 番目の中央 細胞外ループ 2, 3
クラス C の相互作用阻害変異	N 末端領域 細胞外ループ 1

相互作用予測結果に影響を及ぼす変異がいくつかの膜貫通領域に存在する。膜貫通領域は多くの GPCR 間相互作用のインターフェイスとして報告されているため、膜貫通領域に存在する変異によって相互作用阻害、もしくは促進に影響を及ぼす可能性がある。クラス A GPCR の膜貫通領域に存在する相互作用阻害変異は 3 番目の中央に集積しており、クラス B GPCR の膜貫通領域に存在する相互作用阻害変異は 7, 5 番目に集積していた。一方、クラス C の GPCR において相互作用阻害変異は膜貫通領域ではなく N 末端領域に集積していた。クラス C の GPCR は N 末端領域に

Venus flytrap (VFT) ドメインと呼ばれる大きなドメインを有している。この VFT ドメインを介してクラス C の GPCR 同士がホモダイマーやヘテロダイマーを形成することが報告されており、N 末端領域に変異が存在することによって相互作用を阻害する可能性が示唆された。

5. 結論

GGIP を使用して、GPCR 間相互作用に影響を及ぼすがん関連変異を予測した結果、変異の傾向や変異が集積している領域を特定することができた。相互作用阻害変異の傾向は分子全体において、分子表面残基において、膜貫通領域表面においてそれぞれ異なることが示された。相互作用のインターフェイスとして報告されている膜貫通領域表面において相互作用阻害に最も影響を与えた変異は Ala から Asp であった。Ala は中性アミノ酸、Asp は酸性アミノ酸であり、疎水性スコアの変動も 1.8 から -3.5 と大きかった。このため、アミノ酸の性質や疎水性スコアの変動によって相互作用が阻害された可能性が示唆された。一方、相互作用促進変異の傾向は分子全体において、分子表面残基において、膜貫通領域表面においてほとんど変わらなかった。また、膜貫通領域表面に存在する変異の傾向としては Gly への変異が最も相互作用促進に影響を与えた。Gly への変異により膜タンパク質の相互作用において重要な GXXXG モチーフが作成されることで相互作用を促進する可能性が示唆された。また、がんに関連する変異が GPCR のどの領域に存在しているかを解析した結果、クラスごとに集積している領域が異なることが示された。GPCR 間相互作用に影響を及ぼすがん関連変異が細胞内機構にどのように影響を及ぼすかを解明することが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito Akira, Tsuchiya Daiki, Sato Seiji, Okamoto Atsushi, Murakami Yoichi, Mizuguchi Kenji, Toh Hiroyuki, Nemoto Wataru	4. 巻 1
2. 論文標題 Update of the GRIP web service	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Receptors and Signal Transduction	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10799893.2020.1734821	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 Wataru Nemoto, Akira Saito	4. 巻 40
2. 論文標題 Interface prediction for GPCR oligomerization between transmembrane helices.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology (Springer).	6. 最初と最後の頁 99-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1468-6	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 Nemoto W, Yamanishi Y, Limviphuvadh V, Fujishiro S, Shimamura S, Fukushima A, Toh H.	4. 巻 13
2. 論文標題 A Web Server for GPCR-GPCR Interaction Pair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Endocrinol (Lausanne)	6. 最初と最後の頁 825195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.825195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 島村 幸稀英, Vachiranee Limviphuvadh, 山西 芳裕, 藤 博幸, 根本 航
2. 発表標題 GPCR間相互作用ペアの予測手法
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 優斗, 加藤 彰一郎, 藤 博幸, 根本 航
2. 発表標題 タンパク質機能部位予測に適切な相同配列群選択手法の構築と評価
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島村 幸稀英, Vachiranee Limviphuvadh, 山西 芳裕, 藤 博幸, 根本 航
2. 発表標題 GPCR間相互作用ペアの予測手法
3. 学会等名 第15回GPCR研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakie Shimamura, Vachiranee Limviphuvadh, Yoshihiro Yamanishi, Hiroyuki Toh, Wataru Nemoto
2. 発表標題 Improvement of the method to predict interacting GPCR-GPCR pairs
3. 学会等名 ISMB/ECCB 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eri Hayashi, Yuto Kimura, Shuichi Hirose, Satoko Nakamura, Norimasa Kasiwagi, Chiaki Ogino, Wataru Nemoto
2. 発表標題 A tool to identify variants by genome comparisons of multiple bacterial generations
3. 学会等名 ISMB/ECCB 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 照瀬 裕章, 根本 航, 藤 博幸
2. 発表標題 Autoencoderを用いた配列と構造に基づくGPCR-GPCR相互作用の予測
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakie Shimamura, Vachiranee Limviphuvadh, Sebastian Maurer-Stroh, Yoshihiro Yamanishi, Hiroyuki Toh, Wataru Nemoto
2. 発表標題 Prediction of cancer-associated hotspot mutations that affect GPCR oligomerization
3. 学会等名 JCUP IX - Tokyo, May 24-25, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wataru Nemoto, Shunsuke Fujishiro, Vachiranee Limviphuvadh, Sebastian Maurer-Stroh, Yoshihiro Yamanishi, Hiroyuki Toh
2. 発表標題 Prediction of cancer-associated hotspot mutations that affect GPCR oligomerization
3. 学会等名 International GPCR Symposium, June 29 - June 30, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wataru Nemoto, Sakie Shimamura, Vachiranee Limviphuvadh, Sebastian Maurer-Stroh, Yoshihiro Yamanishi, Hiroyuki Toh
2. 発表標題 Prediction of cancer-associated hotspot mutations that affect GPCR oligomerization
3. 学会等名 Asian Biophysics Association (ABA) Symposium 2018, Melbourne Dec 2-6, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakie Shimamura, Vachiranee Limviphuvadh, Hiroyuki Toh, Wataru Nemoto
2. 発表標題 Prediction of cancer associated hotspot mutations that affect GPCR oligomerization.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会. Zoom開催. (ポスター発表)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋優斗、藤博幸、根本航
2. 発表標題 Construction of a set of appropriate homologous sequences to predict functional regions of a protein.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会. Zoom開催. (ポスター発表)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakie Shimamura, Vachiranee Limviphuvadh, Hiroyuki Toh, Wataru Nemoto.
2. 発表標題 Prediction of cancer associated hotspot mutations that affect GPCR oligomerization.
3. 学会等名 2020 World Conference on Protein Science. (Poster presentation) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	藤 博幸 (Toh Hiroyuki) (70192656)	関西学院大学・理工学部・教授 (34504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
シンガポール	A*STAR			