

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22569

研究課題名（和文）リン酸化モチーフ上のがん特異的変異解析から覗く皮膚がん特異的リン酸化シグナル

研究課題名（英文）Analysis of cancer-specific mutations overlapping on phosphorylation motifs

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞は、シグナル伝達経路を破壊する変異の蓄積によってその表現型を獲得しています。次世代シーケンサー技術の発達により、がん細胞の新規変異に関する膨大な情報が得られているが、高頻度変異を除くほとんどの変異は、がん組織のゲノム不安定性によりランダムに入るパッセンジャー変異の背後に隠れており、発がんへの寄与や機能的役割が調べられることなく埋もれたままになっている。本研究では、細胞内シグナル伝達で重要な役割を持つリン酸化シグナル上に入る変異を総合的に評価する方法を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で開発した解析手法は、シグナル伝達経路のリワイリングを追跡できる。我々の解析手法は膨大な情報から自然選択された結果としての突然変異の意味を考えるきっかけを与え、未知のがんシグナル同定の一助になることが期待される。リン酸化モチーフ上の変異は集団で扱うため高頻度に見えるが、分子単位では、ほとんどが低頻度変異である。がん組織における低頻度遺伝子変異の不均一性は、個別化医療の必要性の根拠にもなっており、個別化医療を進めるうえでもがん化に影響を持つ低頻度遺伝子変異の解析技術の開発は学術的意義が高い。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells acquire their phenotype through the accumulation of mutations that disrupt signaling pathways. Although the development of next-generation sequencing technologies has generated a vast amount of information on novel cancer cell mutations, most mutations, except for high-frequency mutations, are hidden behind passenger mutations that randomly enter due to genomic instability of cancer tissues, and are buried without being investigated for their contribution to oncogenesis and functional roles. This study proposed a method to comprehensively evaluate mutations that enter on phosphorylation signals, which have important roles in intracellular signaling.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：リン酸化 がん特異的変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん組織における遺伝子変異は、がん遺伝子やがん抑制遺伝子に代表される、がんの発生、進化に直接重要な役割を持つドライバー変異と、がん組織のゲノム不安定性によりランダムに入ると考えられるパッセンジャー変異に分類される[1,2]。既知ドライバー遺伝子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、多くがパッセンジャー変異と考えられており、いまだ明らかにされていない[3]。

2. 研究の目的

がん細胞はシグナル伝達経路を混乱させる突然変異の蓄積によりその表現型を獲得する。次世代シーケンス技術の発展は膨大な量の新規がん細胞突然変異の情報を生み出しているが[4]、高頻度な突然変異を除き、ほとんどの変異は、がん組織のゲノム不安定性によりランダムに入るパッセンジャー変異の陰に隠れ、がん化への寄与、機能的役割について調べられずに埋もれている。リン酸化シグナルはキナーゼとその基質(リン酸化サイト)の繋がりで記述できる。キナーゼはヒトで約 500 しかないが、基質のリン酸化サイトは約 20 万報告されている。しかもそのほとんどは生理的役割が分かっていない。この機能未知の膨大なリン酸化サイトの数が、リン酸化シグナルに入った変異の解析を複雑なものにしている。そこで本課題はヒトのリン酸化サイトを、その周辺配列の構造から 178 のリン酸化モチーフに分類し[5,6]、どのモチーフのどの位置に変異がよく入るのか統計的に調べることで、がんで選択的に入る変異の抽出を試みる。

3. 研究の方法

(1) リン酸化モチーフ上のがん特異的変異の頻度解析

申請者はリン酸化サイトの前後 5 アミノ酸の領域をモチーフの単位とし、ヒトゲノム上にコードされたモチーフ上に変異が出現する割合を出現率と定義した。International Cancer Genome Consortium (ICGC)に登録された 51 プロジェクト 6334 人の突然変異データを使い臓器別に各リン酸化モチーフ上のがん特異的変異の出現率をモチーフのポジションごとに計算した。実験 1 では変異の蓄積を客観的に評価できるスコア方法を開発する。予備実験では、これをヒートマップで可視化することで変異のホットスポットを探索した。

(2) リン酸化モチーフ上に変異が蓄積するタンパク質群のネットワーク解析

変異の濃縮したリン酸化モチーフを抽出し、モチーフ中の変異の入るポジションを探索しその頻度を計算した。特定モチーフに変異の入るタンパク質群に機能的偏りがいないか、Gene Ontology (GO)解析を行った。さらにリン酸化モチーフに変異が有意に蓄積されたタンパク質群の相互作用する分子を STRING (<https://string-db.org/>) から抽出し、各モチーフ上への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特定のたんぱく質間ネットワークに変異が蓄積していないか検討した。

4. 研究成果

がん特異的に変異がエンリッチされたリン酸化モチーフを探索するとランダムでなく特定のアミノ酸配列への変異の偏りが観察された(図 1)。特にアルギニン残基への変異の導入は顕著であった。このアルギニンへのがん突然変異の挿入がリン酸化モチーフ特異的なものか、がん特異的変異の入るアミノ酸の頻度を調べたところアルギニンへの変異はリン酸化モチーフであることと関係なく変異が入りやすいことが分かった。一方リジンへの変異は入りにくい傾向が観察された。リン酸化モチーフ上におけるアルギニン残基は AGC キナーゼに対する指向性に大きく関係しており、がん組織における AGC キナーゼシグナルの阻害、もしくは他のキナーゼによる恒常的なリン酸化を促すことが AGC キナーゼシグナルの恒常的活性化を引き起こしている可能性が示唆された。次に組織ごとのリン酸化モチーフ上に入る変異の頻度を調べたところ、皮膚がんで Motif 1 2 上の変異の頻度が高いことが分かった(図 2)。皮膚がんにおける Motif 1 2 の変異がどのような特徴を持つのか調べたところ、転写因子、ジンクフィンガーモチーフ、PH ドメインに関連した遺伝子に変異が偏っていることが分かった。さらに、皮膚がんにおいてどのようなシグナル伝達経路に変異が入っているか STRING の相互作用データベースを使って調べたところ 1023 のノードと 1557 のエッジからなるネットワークの形成が確認された。2 つ以上の遺伝子の相互作用が検出された相互作用ネットワークは 424 ノード 1151 エッジであった(図 3)。この 424 遺伝子についてネットワークの詳細を患者ごとに確認したところ、185 人の患者のうち、104 人が 2 つ以上、46 人が 3 つ以上の Motif12 への変異が確認された。

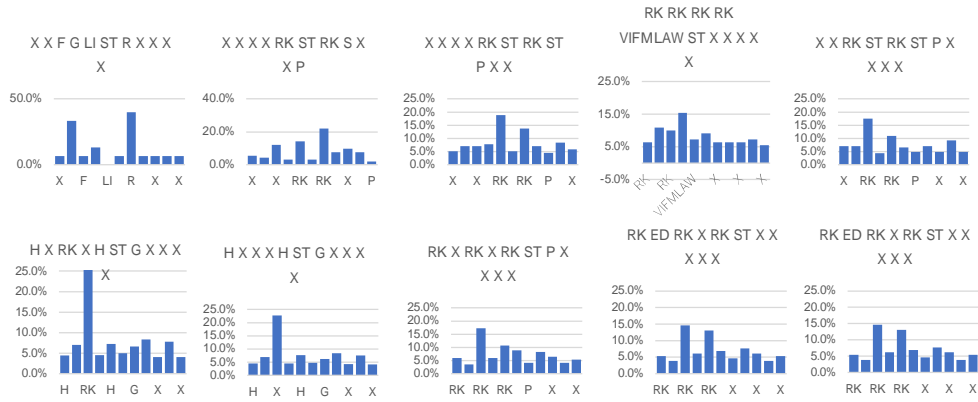


図1 リン酸化モチーフ配列におけるがん特異的変異の分布 (抜粋)

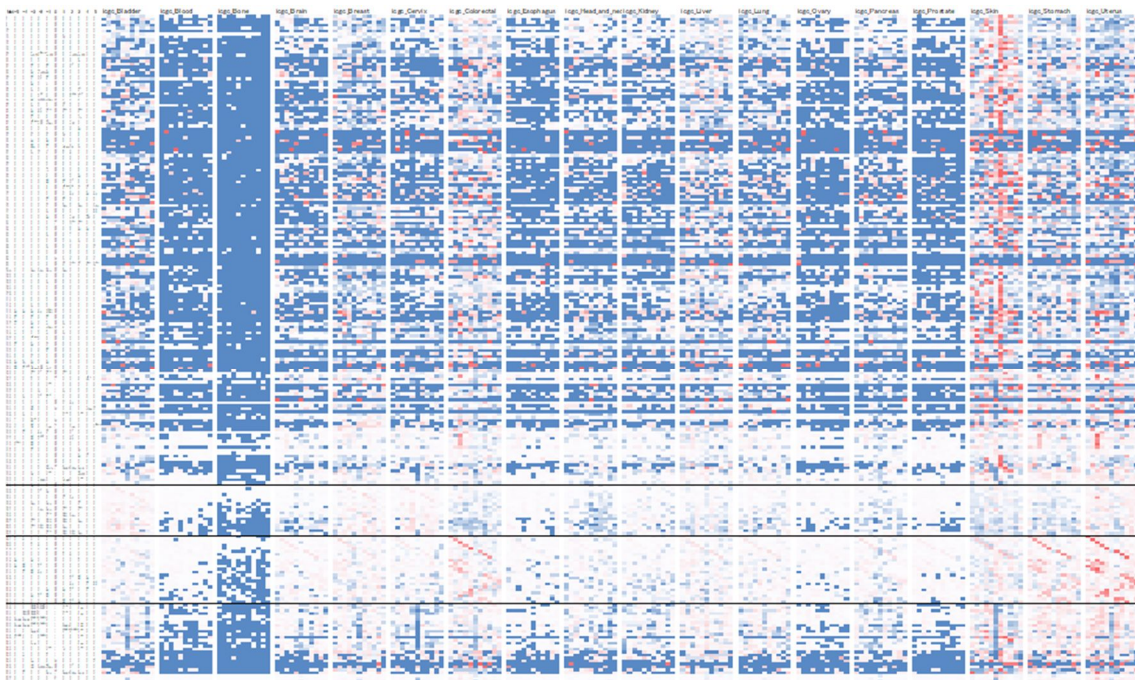


図2 リン酸化モチーフ上に入る組織別がん特異的変異の頻度

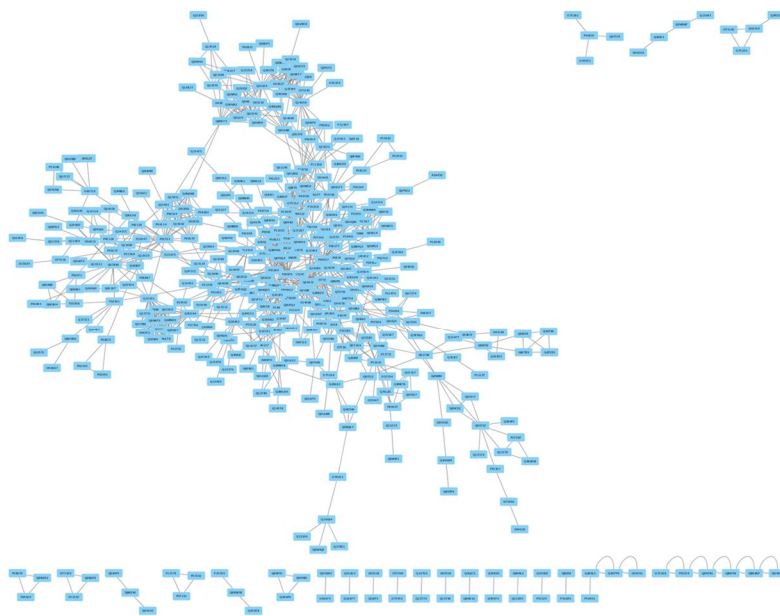


図3ヒト皮膚がんにおけるMotif12変異の入った遺伝子の相互作用ネットワーク

参考文献

1. Supek F, Minana B, Valcarcel J, Gabaldon T, Lehner B (2014) Synonymous mutations frequently act as driver mutations in human cancers. *Cell* 156(6):1324-1335
2. Tomasetti C, Vogelstein B (2015) Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347(6217):78-81
3. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Campbell PJ, Stratton MR (2013) Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer. *Cell reports* 3(1):246-259
4. Fanale D, Amodeo V, Corsini LR, Rizzo S, Bazan V, Russo A (2012) Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers. *Oncogene* 31(17):2121-2128
5. Yoshizaki H, Okuda S (2015) Large-scale analysis of the evolutionary histories of phosphorylation motifs in the human genome. *GigaScience* 4:21
6. Yoshizaki H, Okuda S (2014) Elucidation of the evolutionary expansion of phosphorylation signaling networks using comparative phosphomotif analysis. *BMC genomics* 15(1):546

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yiwei Ling, Hisayoshi Yoshizaki and Shujiro Okuda
2. 発表標題 Genome-wide analysis of mutational impact on post translational modification
3. 学会等名 ISMB/ECCB 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisayoshi Yoshizaki, Shoichi Nishida, Yoshitomo Yasui, Tuyoshi Kuwahara and Miyuki Kohno
2. 発表標題 The role of extracellular matrix proteins in enteric neural crest cell migration
3. 学会等名 The 13th World Congress of The International Cleft Lip and Palate Foundation, The 59th Annual Meeting of The Japanese Teratology Society (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------