

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07953

研究課題名(和文) mTOR・Mnkプロテインキナーゼ系による翻訳調節を介した細胞増殖制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of translational regulation mediated by the crosstalk between mTOR and Mnk signaling pathways in tumorigenesis

研究代表者

福永 理己郎 (Fukunaga, Rikiro)

大阪薬科大学・薬学部・教授(移行)

研究者番号：40189965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の増殖における翻訳制御機構を解明するために、CRISPR/Cas9法を用いてヒトHeLa細胞のMnk1およびMnk2の遺伝子破壊を行い、mTOR経路とMnk経路の相互作用を解析した。その結果、mTORC1を阻害するとMnk2を介して翻訳開始因子eIF4Eのリン酸化が亢進すること、また、Mnk1が各種の増殖刺激によって活性化されるのに対しMnk2は逆に抑制されること、これらの活性制御機構の違いには主にキナーゼドメインのC末端領域が関与することを明らかにした。本研究により、がんの分子標的治療においてmTOR阻害剤とMnk阻害剤の併用効果が期待できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate translational regulation in tumor cell growth, we generated HeLa cells lacking the Mnk1 and/or Mnk2 genes by using the CRISPR/Cas9 method. We found that inhibition of mTORC1 resulted in upregulation of eIF4E phosphorylation and that this signal crosstalk was mediated by Mnk2 but not by Mnk1. We also found that stimulation of cells by growth factors resulted in upregulation of Mnk1-mediated phosphorylation of eIF4E but in suppression of Mnk2-mediated eIF4E phosphorylation, suggesting that Mnk2 is regulated, at least in part, by an unidentified mechanism that would be different from the MAPK pathway but linked to the PI3K-mTOR pathway. This study would raise the potential for combination treatments of mTOR and Mnk inhibitors for tumor therapies.

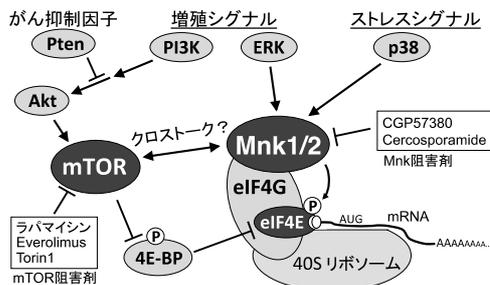
研究分野：分子細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 プロテインキナーゼ 細胞増殖 翻訳制御 MAPキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) Mnk1 及び Mnk2 は, MAP キナーゼによって活性化されるセリン/スレオニン・プロテインキナーゼであり, 哺乳類はじめ脊椎動物でよく保存されている。研究代表者らは, MAP キナーゼの標的蛋白質として Mnk1 を同定し, このプロテインキナーゼが翻訳開始因子 4E (eukaryotic initiation factor 4E; eIF4E) をリン酸化することを示した。キャップ結合蛋白質とも呼ばれる eIF4E は, 真核生物 mRNA の 5' 末端キャップ構造 (m<sup>7</sup>GpppN) に結合して翻訳開始複合体を形成する翻訳調節因子であり, タンパク質合成に必須な役割を果たす。研究代表者らは, Mnk1 と Mnk2 を欠損したマウスを作製することにより, Mnk1/2 が生体内で ERK や p38MAP キナーゼによって活性化されて eIF4E の Ser209 残基をリン酸化する唯一の生理的プロテインキナーゼであることを証明した (Mol.Cell.Biol. 24, 6539, 2004)。

(2) 他方, eIF4E は翻訳開始の律速因子であると考えられており, その過剰発現によってタンパク合成が促進されることが報告されていた。また, 多くの悪性腫瘍 (大腸癌, 肺癌, リンパ腫など) (大腸癌, 肺癌, リンパ腫など) において eIF4E が過剰発現しており (Chemistry & Biology 21, 441, 2014), 細胞の癌化・悪性化に伴うタンパク合成促進に重要な役割を果たしている。eIF4E の活性は主に mTOR と Mnk の2つのプロテインキナーゼ経路で制御されることが近年明らかになってきた (下図)。mTOR は PI3K の下流で活性化され, eIF4E の阻害因子である 4E 結合蛋白質 (4E-BP) をリン酸化して不活化することにより, eIF4E の開始複合体形成を促進してタンパク質合成を強く亢進する。一方, Mnk による eIF4E のリン酸化は, 細胞外刺激によるタンパク合成パターンの急速な変化や特定の mRNA の選択的翻訳に機能することが示唆されているが, その分子機構については不明な点が多かった。



(3) 以上の研究背景に基づき, 研究代表者らは, mTOR 経路の阻害によって Mnk 経路が活性化されることを見出し, (Mol.Cell.Biol.27,7405,2007; Mol.Pharmacol. 78, 778, 2010; Oncotarget 5, 8442, 2014), グローバルな翻訳抑制に対して Mnk を介したフィードバック機構が存在することを示した。一方で研究代表者らは, Mnk1/2 二重欠損マウスでは癌抑制遺伝子 Pten の欠失によるリンパ腫の発症が野生型マウスより遅延することを

明らかにした (Ueda et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 107, 13985, 2010)。以上の研究背景のもと, 研究代表者らは以下の目的を達成するために本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究では, 2つの主要な翻訳制御経路である mTOR 経路と Mnk 経路のクロストークによる細胞増殖制御の分子機構の解明を目的とし, 具体的には以下の3つの主題に焦点をしばって研究を遂行した。

(1) mTOR 経路と Mnk 経路のクロストークによる翻訳制御の分子機構を解明し, mTOR 阻害剤と Mnk 阻害剤の併用による細胞増殖抑制効果の分子的基盤を明らかにする。

(2) Mnk1/2 の誘導的活性化システムおよび誘導的ノックダウンシステムを作製し, Mnk を介して翻訳制御を受けるタンパク質をプロテオーム解析によって同定する。

(3) 活発に翻訳されている mRNA 群の網羅的解析法であるトランスレイトーム (Translatome) 解析によって, mTOR/Mnk 翻訳制御システムの標的 mRNA 群を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Mnk1 と Mnk2 の活性化機構や生理的機能の違いを解析するために, ヒト Mnk1 と Mnk2 のキメラ分子を作成した。具体的には Mnk1 と Mnk2 のアミノ酸配列を相同性に基づいて整列させ, キナーゼドメインの N 末端側境界部位, C 末端側境界部位, およびキナーゼドメインの N ロープと C ロープの境界部位の3カ所で両者の配列が互換わるキメラ分子を計6種類作成した。

(2) ヒト Mnk1 に種々の点変異や欠失変異を導入した変異体や, ヒト Mnk1/Mnk2 キメラ分子をレトロウイルスベクターあるいはリポフェクション法によってマウス Mnk1/2-ダブルノックアウト (DKO) 細胞や HeLa 由来 Mnk-DKO 細胞 (下記) に導入した。これらの細胞をウシ胎仔血清や過バナンジン酸で刺激し, Mnk1, Mnk2 の活性化の指標として eIF4E の Ser209 リン酸化をウエスタンブロットによって解析した。また, mTOR シグナル経路と Mnk 経路のクロストークについて解析する目的で, mTORC1 特異的阻害剤である Everolims および mTORC2 の両者を阻害する Torin1 について, eIF4G (Ser1108) のリン酸化や eIF4E (Ser209) のリン酸化を主な指標として解析した。各部位のリン酸化レベルは, リン酸化特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。

(3) CRISPR/Cas9 システムを利用してヒト HeLa 細胞の Mnk1 および Mnk2 遺伝子のノックアウトを試みた。CRISPR と Cas9 を同時に発現させら

れる pX330 プラスミドを用いてヒト Mnk1 遺伝子および Mnk2 遺伝子のそれぞれ 2ヶ所ずつを標的とする発現ベクターを作成し、ピューロマイシン耐性遺伝子を有するプラスミド(pUREF-EX)との共トランスフェクションを行い、トランスフェクション後に約1日間だけのピューロマイシン選択処理を行い、薬剤耐性となった HeLa 細胞集団を選択して以後の実験に使用した。

(4) ヒト Mnk1 に対する2種類の miR30-mimetic shRNA (Mnk1-5 および Mnk1-7)を設計し、pLMP 発現プラスミドに挿入した。これらを HEK293T 細胞で発現させ、抗ヒト Mnk1mAb を用いたウエスタンブロットによりノックダウンの検討を行なった。他方、レトロウイルスベクター系を用いてヒト Mnk1 を高発現するマウス Mnk-DKO 細胞を樹立した。この細胞を用いて、蛍光2次元電気泳動法によるプロテオーム発現差異解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) マウス由来 Mnk ノックアウト細胞(Mnk1-KO, Mnk2-KO, および Mnk1/2-ダブル KO マウスの株化線維芽細胞)を用いて、増殖因子や過パナジン酸刺激による Mnk 活性化動態を検討した結果、Mnk2-KO 細胞では上記の刺激によって eIF4E のリン酸化が速やかに誘導されるのに対し、Mnk 1-KO 細胞では eIF4E リン酸化が逆に低下することを見出した。すなわち、Mnk1 が存在しない条件下では、増殖刺激によって Mnk2 の不活化と eIF4E の脱リン酸化が促進されることを見出した。

(2) そこで、Mnk1 と Mnk2 の活性制御機構の違いを解析する目的で、ヒト Mnk1 とヒト Mnk2 のキメラ分子の発現プラスミドを6種類構築した。これらを Mnk1/2 ダブル KO 細胞で発現させて増殖刺激による Mnk 活性化動態を検討した結果、Mnk1 型(誘導的活性化)、Mnk2 型(誘導的不活性化)、及び中間型(活性不変)に分類でき、活性化動態を決定するのは主に 2 か所のリン酸化部位(ヒト Mnk1 の Thr209 及び Thr214)を含むドメインであることが明らかになった。

(3) トランスレイトーム解析(mRNA 翻訳プロファイリング)の前段階として、Mnk-ダブル KO 細胞と、これに Mnk1 を発現させた細胞を用いて、二次元差分電気泳動(2D-DIGE)によるプロテオーム解析を行った。その結果、Mnk1 の発現条件下でタンパク質レベルが低下する候補タンパク質として KRIT1(Krev-interaction trapped 1)を同定した。KRIT1 は Ras-MAP キナーゼ経路への関与が示唆されており、KRIT1 mRNA の翻訳効率が Mnk1 によって制御される可能性が示された。

(4) miR30 模倣 RNA 発現系を利用して各種のヒト由来細胞で Mnk1 を誘導的に発現抑制する系の樹立を試み、同一標的に対する複数の miR30 模倣 RNA を共発現させることで抑制効率が

高まることを見出した。しかし、この Mnk1 ノックダウン系では eIF4E リン酸化の生理的機能を解析する目的には不十分であると判断し、CRISPR/Cas9 システムによるノックアウトを試みる計画に変更した。

(5) CRISPR/Cas9 システムを利用してヒト HeLa 細胞の Mnk1 および Mnk2 の遺伝子ノックアウトを試みた。クローン単離を経ずにノックアウト細胞を樹立する目的で、一過性ピューロマイシン選択法の条件検討を行った結果、HeLa 細胞で迅速・簡便に遺伝子ノックアウトできる条件を見出した。また、ヒト HEK293T 細胞でも同様の方法で遺伝子ノックアウトできることを確認した。そこで、この手法を用いて HeLa 細胞由来の Mnk1-KO, Mnk2-KO, 及び Mnk1/2 ダブル KO 細胞を作成し、内在性 Mnk1 あるいは Mnk2 の発現が検出限界以下に低下していることを確認した。

(6) 得られた HeLa 由来 Mnk1-KO 細胞および HEK293T 由来 Mnk1-KO 細胞では、マウス Mnk1-KO MEF 細胞と同様の活性化動態、すなわち血清による増殖刺激によって eIF4E のリン酸化が低下する現象が観察され、Mnk2 活性制御の普遍性が示唆された。Mnk1 と Mnk2 の活性制御機構の違いが HeLa および HEK293T 細胞で確認されたことから、様々なヒト由来がん細胞について Mnk1/2 のノックアウトを行って、細胞増殖に及ぼす影響を解析する意義が再確認された。

(7) mTORC1 シグナル伝達複合体の阻害剤である Everolimus を用いてクロストークの経路について解析した。その結果、Everolimus 処理は Mnk1 の活性には影響しないが、Mnk2 を介した eIF4E リン酸化が促進される事が明らかとなった。mTORC1 阻害によって mTORC2 がフィードバック活性化されることが報告されており、上記の結果から mTORC2 から Mnk2 へのクロストークが存在する可能性が示唆された。他方、上記 HeLa 由来 Mnk-KO 細胞を用いて JNK 経路の関与について解析したところ、Mnk1-KO 細胞における eIF4E リン酸化が JNK 阻害剤 SP600125 あるいは CC-401 のいずれによっても強く阻害されること、Mnk2-KO 細胞では阻害効果は認められないことを見出した。この結果は Mnk2 の活性化に JNK 経路が関与している可能性を示唆しており、Mnk1/Mnk2 は ERK または p38 によってのみ活性化されるという従来の知見について再検討する必要が生じた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Cendrowski, J., Fukunaga, R., Real, F. X.他 (計11名中8番目): Mnk1 is a novel acinar cell-specific kinase required for exocrine pancreatic secretion and response to pancreatitis in mice. Gut 査読あり, 64, 937 -947

(2015). DOI: 10.1136/gutjnl-2013-306068

〔学会発表〕(計6件)

小笠原慎, 井上潤子, 大谷侑平, 金谷祥吾, 水野和史, 藤井忍, 藤井俊裕, 尾崎恵一, 福永理己郎: CRISPR/Cas9 システムによる Mnk1/ Mnk2 ノックアウト HeLa 細胞の作成とシグナル伝達経路の解析: 生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会, 第90回日本生化学会大会), 2P-0473(2017年12月, 神戸)

金谷祥吾, 辻野裕介, 大谷侑平, 藤井忍, 井上晴嗣, 福永理己郎: 増殖刺激による Mnk の活性化動態, および mTOR/Mnk 阻害剤の効果の解析: 第66回日本薬学会近畿支部大会, C-16-1(2016年10月, 高槻)

宮谷京平, 田淵三香子, 大谷侑平, 藤井忍, 井上晴嗣, 福永理己郎: 任意のN末端配列を有する組換えマウス IL-36 の大腸菌による産生と精製: 第66回日本薬学会近畿支部大会, P-AM-2-22(2016年10月, 高槻)

井上潤子, 大谷侑平, 藤井忍, 井上晴嗣, 福永理己郎: CRISPR/Cas9 システムによる Mnk1 遺伝子ノックアウト HeLa 細胞の作成と解析: 第66回日本薬学会近畿支部大会, P-AM-2-32(2016年10月, 高槻)

溝端彩花, 藤井忍, 福永理己郎, 井上晴嗣: 哺乳類細胞発現系を用いた組換えヒトロイシンリッチ 2-グリコプロテインの生産と精製: 第66回日本薬学会近畿支部大会, P-AM-2-23(2016年10月, 高槻)

川向真実, 藤井忍, 井上晴嗣, 土屋孝弘, 宮本勝城, 辻坊裕, 福永理己郎: コリスミ酸の調製とイソコリスミ酸合成酵素の大腸菌による発現: 第66回日本薬学会近畿支部大会, P-AM-2-13(2016年10月, 高槻)

〔図書〕(計1件)

福永理己郎 他: 羊土社, 「サイトカイン・増殖因子キーワード事典(宮園浩平 他編)」第3章 増結因子, 2015, pp99-116

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyushitu/seika.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福永理己郎(FUKUNAGA, RIKIRO)  
大阪薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 40189965

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし