

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590105

研究課題名(和文) Mnk プロテインキナーゼ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 Mechanisms for cell growth regulation by Mnk-mediated translational control

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Mnkプロテインキナーゼによる翻訳調節を介した細胞増殖制御機構について解析し、Mnk1の活性化によってeIF4GのSer残基(Ser1105/1106)が急速にリン酸化されることを見いだした。また、ヒト髄芽腫細胞でmTORC1を阻害するとeIF4EのSer209リン酸化が亢進すること、このフィードバック的eIF4Eリン酸化はMnk1ではなくMnk2によって媒介されることを見いだした。さらに、Mnk2の活性抑制によって髄芽腫細胞のmTOR阻害剤感受性が高まることから、mTOR阻害剤とMnk阻害剤の併用による髄芽腫治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated molecular mechanisms for cell growth regulation by Mnk-mediated translational control. We found that activation of Mnk1 resulted in rapid phosphorylation of eIF4G at Ser1105/1106. We also showed that inhibition of mTORC1 upregulated phosphorylation of eIF4E at Ser209 in human medulloblastoma cells, and that this feedback phosphorylation of eIF4E was mediated by Mnk2 but not by Mnk1. Furthermore, suppression of Mnk2 activity sensitized medulloblastoma cells to mTOR inhibitors, raising the potential for combination treatments of mTOR and Mnk inhibitors for the treatment of medulloblastoma.

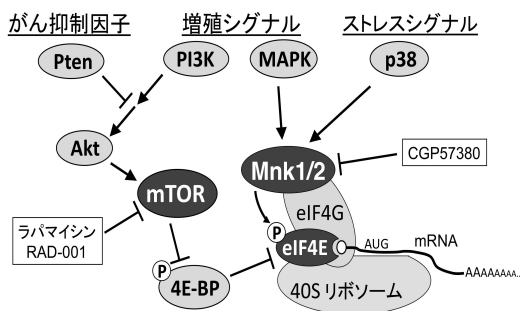
研究分野：分子細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 プロテインキナーゼ がん細胞 翻訳制御

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に広く分布している。研究代表者らは、MAP キナーゼの標的タンパク質として Mnk1 を同定し (EMBO J. 16, 1921, 1997)、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 (EMBO J. 18, 270, 1999)。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分子であり、タンパク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) において eIF4E が過剰発現していることが報告されており (Cancer Res. 68, 631, 2008)、細胞の癌化に伴うタンパク合成促進に重要な役割を果たすと考えられる。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たが、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、(Wang et al., Mol. Cell. Biol. 27, 7405, 2007; Altman et al., Mol. Pharmacol. 78, 778, 2010)、グローバルな翻訳抑制に対するフィードバック機構の存在が示唆された。一方で研究代表者らは、Mnk1/2 二重欠失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、申請者らは以下の目的のために本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、Mnkによる翻訳調節を介した細胞増殖制御の分子機構を解明する事を目的とし、具体的には以下の3つの項目に焦点を絞って研究を遂行した。

(1) MnkによるeIF4Eのリン酸化を介して特定のmRNAの翻訳が促進される分子機構を解明する。

(2) トランスレイトーム解析 (mRNA 翻訳プロファイリング) の改変法を開発して、Mnkの標的となるmRNA群を同定すると共に、eIF4Eのリン酸化によって制御されるmRNA群の解明を試みる。

(3) mTOR経路の阻害によってMnk経路が活性化されるネガティブフィードバックのシグナル経路を解明し、mTOR阻害剤とMnk阻害剤の併用による細胞増殖抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト Mnk1 に種々の点変異や欠失変異を導入して、優勢ネガティブ変異体や構成的活性化型変異体などを作製した。これらの変異体や野生型 Mnk1 をレトロウイルスベクターを用いて Mnk1/2-ダブルノックアウト (DKO) マウスの不活化胚性線維芽細胞 (MEF) に導入し、安定発現細胞株を樹立した。これらの細胞を発がんプロモーター (TPA) や増殖因子で刺激し、翻訳制御に関わる mTOR シグナル系および Mnk シグナル系について、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。

(2) ヒト Sprouty2 の N 末端に HA タグを接続させた野生型の cDNA、および Ser112 および Ser212 の 2 残基について Ala に置換した変異体 (S112/212A 変異体) をヒト HEK293 細胞あるいは Mnk-DKO-MEF 細胞に導入し、Mnk1/2 によるリン酸化動態について解析した。細胞内における Sprouty2 のリン酸化は、Phos-Tag 試薬含有 SDS ゲル電気泳動における移動度シフトをウエスタンブロットで解析することによって評価した。

(3) 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ロックダウンの検討を行なった。

(4) Mnk1とMnk2の活性化機構の違いや生理的機能の違いを解析するために、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乗り換わるキメラ分子を計6種類作成した。

#### 4. 研究成果

(1) Mnk1変異体を発現させたMnk-DKO-MEF細胞を増殖因子やストレスで刺激した際のmTORシグナル系およびMnkシグナル系の動態について、eIF4G(Ser1108)のリン酸化やeIF4E(Ser209)のリン酸化を検出するリン酸化特異抗体を用いて解析した。その結果、Mnk1を強制発現させたMnk-DKO-MEF細胞を増殖因子で刺激すると、eIF4EのSer209のリン酸化に伴ってeIF4GのSer1108のリン酸化レベルが急速に低下する現象を見出した。そこで、脱リン酸化阻害剤(オカダ酸やCyclosporin)および各種のMnk1変異体を用いてSer1108の脱リン酸化について検討した結果、プロテインホスファターゼの活性化が関与しているのではなく、Ser1108近傍のSer1105あるいはSer1106残基がリン酸化されることによって抗pSer1108抗体による認識が阻害された結果である可能性が示唆された。今後は、eIF4GのSer1105/1106リン酸化の生理的意義の解析を行う。

(2) eIF4EやeIF4GとMnk1との相互作用について免疫沈降法を用いて解析した結果、構成的活性化変異(Thr344Glu変異)を有するMnk1が、基質であるeIF4Eと比較的安定な複合体を形成することを見出した。野生型Mnk1や他の変異体では安定複合体を形成しないことから、Thr344Glu変異体は、いわゆる基質トラップ変異体であると考えられる。基質トラップ変異体はMnk1の基質タンパク質を探索する目的において極めて有用であり、Mnk1の他の点変異との組み合わせによって高い効率で基質と会合する可能性が示唆された。今後、この基質トラップ変異体を利用してMnk1の道の標的タンパク質の同定を試みる。

(3) ヒトSprouty2はショウジョウバエSproutyのホモログであり、増殖因子受容体チロシンキナーゼ情報伝達系の負の制御分子として重要な機能を担っている。Sprouty2の機能がMnk1/2によって制御されることが報告されたことから、Mnk1/2が直接にSprouty2をリン酸化する可能性について検討した。HA-Spry2発現ベクターをMnk1と共にHEK293T細胞に導入し、HA-Sprouty2のSDS-PAGE上における移動度シフトによってリン酸化解析を行なった結果、Mnk1の活性化に伴って細胞内でSprouty2がリン酸化される事が示唆された。Sprouty2のリン酸化部位と予想されるSer112およびSer121のAla変異Sprouty2ではリン酸化レベルの低下が認められたが、変異Sprouty2でもシフトバンドが残存することから、S112/S212以外にも

Mnk1のリン酸化部位が存在することが示唆された。

(4) がん細胞の増殖におけるMnk1の役割を解析するために、ヒトMnk1に対するmiR30-mimetic shRNAを2種類(Mnk1-5およびMnk1-7)設計した。Mnk1-5あるいはMnk1-7の単独発現によって内在性Mnk1の発現抑制が認められたが、両者をCo-transfectionするとさらに効果的であることが分かった。また、HEK293細胞でMnk1の発現を抑制すると、細胞内eIF4EのSer209リン酸化レベルが低下することが明らかになった。今後は、各種がん細胞でMnk1のノックダウンを行い、細胞増殖への影響を検討する。

(5) 髄芽腫におけるmTOR経路とMnk経路のクロストークについて解析を行った。Daoy髄芽腫細胞をラパマイシンで処理するとeIF4EのSer209リン酸化が亢進すること、このmTOR阻害によるフィードバックリン酸化はMnk1ではなくMnk2によって媒介されることを見いだした。また、Daoy細胞のMnks阻害剤処理やMnk2のノックダウンによって細胞のmTOR阻害剤感受性が高まり、足場非依存性増殖能の低下が認められた。以上により、髄芽腫Daoy細胞ではmTOR阻害によるフィードバック制御を受けてMAPキナーゼ非依存的にMnk2を活性化するシグナル経路が存在することが明らかとなり、mTOR阻害剤とMnk阻害剤の併用による髄芽腫治療の可能性が示唆された。Mnk2がMnk1とは異なる機構で活性化されることから、これらの活性化機構と生理的機能の相違を明らかにする目的で、Mnk1とMnk2のキメラ分子を作成した。今後、これらのキメラ分子を用いてmTOR阻害のフィードバック作用点を明らかにする予定である。

(6) 固相リン酸化スクリーニング法によってMAPキナーゼの新規標的タンパク質の探索を行い、新たにプロテインホスファターゼPTP9Q22を同定した。PTP9Q22はN末端側にチロシンホスファターゼドメインを有し、C末端側ドメインがMAPキナーゼの活性化に伴ってリン酸化されることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7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

Eckerdt, F., Beauchamp, E., Bell1, J., Iqbal, A., Su, B., Fukunaga, R., Lulla, R. R., Goldman, S., and Plataniias, L. C.: Regulatory effects of a Mnk2-eIF4E feedback loop during mTORC1 targeting of human medullo- blastoma cells.

Oncotarget, 査読あり, 5, 8442-8451 (2014).  
PMID: 25193863

Panja, D., Fukunaga, R., Bramham, C.R.他  
(計 10 名中 7 番目): Two-stage translational  
control of dentate gyrus LTP consolidation is  
mediated by sustained BDNF-TrkB signaling to  
MNK. *Cell Rep.* 査読あり, 9, 1430-45 (2014).  
DOI: 10.1016/j.celrep.2014

Chevillard-Briet M, Fukunaga R, Escaffit F.  
他(計 13 名中 11 番目): Interplay between  
chromatin-modifying enzymes controls colon  
cancer progression through Wnt signaling. *Hum  
Mol Genet.* 査読あり, 23, 2120-2131 (2014).  
DOI: 10.1093/hmg/ddt604

Gorentla, B. K., Krishna, S., Shin, J., Inoue,  
M., Shinohara, M. L., Grayson, J. M.,  
Fukunaga, R., and Zhong XP.: Mnk1 and 2 are  
dispensable for T cell development and  
activation but important for the pathogenesis of  
experimental autoimmune encephalo- myelitis. *J.  
Immunol.*, 査読有り, 190, 1026-1037 (2013).  
DOI: 10.4049/jimmunol. 1200026

Shi, Y., Frost, P., Hoang, B., Yang, Y.,  
Fukunaga, R., Gera, J., & Lichtenstein, A.:  
MNK kinases facilitate c-myc IRES activity in  
rapamycin-treated multiple myeloma cells.,  
*Oncogene* 査読有り, 32, 190-197 (2013). DOI:  
10.1038/onc.2012.43

Sharma, B., Fukunaga, R., Plataniias, L. C.  
他(計 16 名中 12 番目): Sprouty proteins are  
negative regulators of interferon (IFN)-signaling  
and IFN-inducible biological responses. *J.  
Biol.Chem.* 査読有り, 287, 42352-42360 (2012).  
DOI: 10.1074/jbc. M112.400721

〔学会発表〕(計 3 件)

マウスロイシンリッチ<sub>2</sub> グリコプロテインとシト  
クロム c の相互作用: 中村舞音, 松村有紗, 矢野  
可央里, 藤井忍, 福永理己郎, 池田潔, 井上晴  
嗣, 第 87 回日本生化学会大会, 2P-098(2014  
年 10 月, 京都)

ロイシンリッチ<sub>2</sub> グリコプロテインとシトクロム  
c の相互作用: 井上晴嗣, 福永理己郎, 他(計 6  
名)日本薬学会第 134 年会, 28amM-049(2014  
年 3 月, 熊本)

新規シグナル分子としての細胞外シトクロム  
c の機能: 西村恵子, 福永理己郎, 井上晴嗣,  
他(計 9 名)第 86 回日本生化学会大会, 3P-126  
(2013 年 9 月, 横浜)

〔図書〕(計 1 件)

福永理己郎 他, 医薬ジャーナル社, G-CSF

(顆粒球コロニー刺激因子)の基礎と臨床: 第 1  
章(1)G-CSF および G-CSFR の構造と機能,  
2013, pp16-27

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/s  
eika.html](http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/s<br/>eika.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