

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07118

研究課題名(和文) TCTPによる翻訳活性化を介した新規NF1腫瘍促進シグナル分子群の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of a novel molecular signal network related to NF1 tumorigenesis via the activation of translation mediated by TCTP

研究代表者

小林 大樹 (Kobayashi, Daiki)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20448517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経線維腫症1型(NF1)病態発症機序の解明を目的として、TCTPを介した翻訳制御機構のNF1腫瘍細胞内における役割を検討した。TCTPは翻訳伸長因子複合体と有意に結合しており、特にTCTPはEF1A2との特異的相互作用をコアとした翻訳伸長因子群と複合体を形成することによって、NF1腫瘍細胞内のタンパク質翻訳を促進していることが明らかとなった。したがって、TCTPはEF1A2を主体としたタンパク質翻訳伸長反応を活性化することにより、NF1腫瘍の病態を進行させていることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経線維腫症1型(NF1)は悪性腫瘍を含む多彩な病態を示す遺伝性疾患である。NF1の詳細な分子機序や病態マーカーおよび治療標的は報告されておらず、治療法は対処療法のみである。本研究により、TCTPを介した翻訳制御機構が明らかとなり、NF1腫瘍の病態を進行させていることが考えられ、その機能阻害がNF1腫瘍の治療標的として有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the pathogenesis of neurofibromatosis type 1 (NF1), we investigated the role of TCTP-mediated translational control mechanism in NF1 tumor cells. TCTP significantly binds to the translation elongation factor complex, and in particular, TCTP forms a complex with the translation elongation factors including EF1A2, which promotes protein translation in NF1 tumor cells. Therefore, This study demonstrates that TCTP promotes the pathogenesis of NF1 tumor by activating the protein translation elongation by interacting with EF1A2.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：NF1 TCTP 悪性腫瘍 EF1A2 翻訳伸長因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経線維腫症 1 型は、多発性神経線維腫を始めとする多彩な病態を示す遺伝性疾患である。原因遺伝子産物 Neurofibromin は、Ras-GAP 相同領域を有し、Ras の下流である MAPK シグナル、および PI3K-AKT シグナルなどの細胞内シグナル伝達の重要な調節因子と考えられている。NF1 原因遺伝子の同定により本疾患群の発症機序が明らかになり、治療や予防法が開発されるものと期待された。しかしながら、遺伝子構造から予想される産物の機能と疾患の表現型との間にはなお大きな距離があり、具体的な治療法・予防法に関しては、リスクを伴う腫瘍の外科的摘出術による一時的な対処療法以外には存在しないのが現状である。

本研究に先行して、NF1 遺伝子に特異的な siRNA を処理した神経系細胞を NF1 病態モデルとして用い、新しい融合プロテオミクス手法によって、新規 NF1 病態関連分子として Translationally controlled tumor protein (TCTP) を同定した。

TCTP は酵母からヒトにいたるまで、真核生物の種間で構造、および機能面において高度に保存されており、多彩な機能を示すタンパク質である。特にアポトーシスの抑制、タンパク質の合成、細胞分裂に関わる機能などの面から、TCTP は腫瘍との関連が示唆されている。

TCTP は NF1 遺伝子欠損細胞において、Ras の下流である MAPK シグナル、PI3K-AKT シグナルを介した mTOR の活性化により発現が増加すること、および NF1 腫瘍組織の悪性度に相関して発現が上昇し、とくに NF1 腫瘍で最も悪性度の高い悪性抹消神経鞘腫 (MPNST) で発現が顕著であることが明らかとなった。しかしながら、TCTP は多彩な機能を有する蛋白質であることから、NF1 腫瘍内における TCTP の詳細な生物学的役割については明らかとなっていない。

2. 研究の目的

新規 NF1 病態関連因子 TCTP を標的とした NF1 腫瘍の新規治療法の開発を目指し、本研究では、NF1 腫瘍内における TCTP の分子機能、および生物学的役割について詳細に解析し、TCTP の NF1 腫瘍発症機序への寄与、および NF1 腫瘍治療のターゲットとしての有用性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 発現ベクターを用いて NF1 腫瘍 (MPNST) 細胞内に TCTP-FLAG タグ融合タンパク質を強制発現させ、FLAG 抗体を用いて共免疫沈降複合体を精製し、超微量還元アルキル化・Trypsin/LysC 消化処理の後、nanoLC-ESI- MS/MS 解析、SWATH (sequential window acquisition of all theoretical spectra) による定量解析により、TCTP 複合体分子群の網羅的同定を行った。

(2) 分子ネットワークデータベースと分子機能オントロジーを用いたインシリコ解析により、TCTP と相互作用する分子群を機能分類し、TCTP の NF1 腫瘍内における役割を推定した。

(3) TCTP と相互作用する新規分子群について、同定された TCTP 結合タンパク質の共免疫沈降によって、TCTP との相互作用形式を解析した。また TCTP 結合タンパク質の NF1 腫瘍内での機能について検証した。

4. 研究成果

(1) TCTP-FLAG 発現プラスミド、および TCTP-FLAG 非発現プラスミド (MOCK-FLAG) 導入 MPNST 細胞由来のタンパク質溶液から FLAG 抗体免疫沈降によって、TCTP と複合体を形成するタンパク質を抽出した。この複合体形成タンパク質を質量分析によって解析した結果、25712 スペクトルを検出し、11481 ペプチド、346 種のタンパク質を同定した。さらに SWATH 定量解析によって、定量可能であった 339 種のタンパク質の内、113 種の TCTP の結合タンパク質 (SWATH による基準値: TCTP-FLAG のイオン強度/MOCK-FLAG のイオン強度の比 4、有意差 95%以上) を同定し、分子ネットワークデータベース STRING (<https://string-db.org/>) を用いて解析した。その結果、TCTP 結合タンパク質は、1. タンパク質翻訳、2. ストレス応答、3. 細胞骨格、4. その他、と大きく 4 種類の機能に分類されることが判明した (図 1)。

(2) TCTP 結合タンパク質の定量解析によって、TCTP は翻訳伸長因子複合体 (EF1A、EF1B、EF1D、EF1G、VARS) と最も特異的に結合していることが示唆された。興味深いことに、TCTP は NF1 腫瘍細胞内において、2 種の翻訳伸長因子 EF1A1、EF1A2 との相互作用が検出され、SWATH 定量解析により両者の TCTP との結合親和性を評価した結果、特に TCTP は EF1A1 よりも EF1A2 と特異的に結合することが考えられた (SWATH 定量値 TCTP/MOCK = EF1A1: 19.1, EF1A2: 82.7)。

EF1A はタンパク質の翻訳伸長過程において、tRNA をリボソームに運搬する機能を有している。哺乳類の EF1A には主に、全組織に普遍的に発現している EF1A1 と、脳神経系、心臓、筋骨格にのみに限局して発現している EF1A2 が存在している。EF1A1 と EF1A2 は 92% の配列同一性を有しており、機能の違いに関しては明らかとなっていない。

TCTP の EF1A2 への結合の特異性を検証するため、EF1A1、EF1A2 それぞれの FLAG 融合体発現系を構築し、MPNST 細胞内に強制発現させ、SWATH 定量解析により細胞内 TCTP および翻訳伸長因

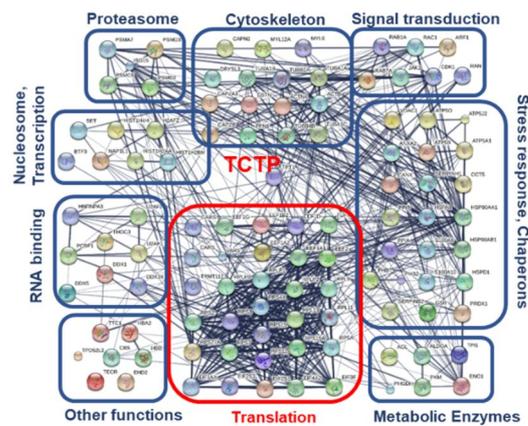


図 1. 113 種の TCTP 結合タンパク質の分子ネットワーク解析

子複合体構成タンパク質の結合量を評価した。その結果、EF1A1、EF1A2 は、翻訳伸長因子 EF1B、EF1D、EF1G、VARS と高レベルに相互作用している一方で、TCTP との相互作用は、EF1A2 で優位に確認された (図 2)。

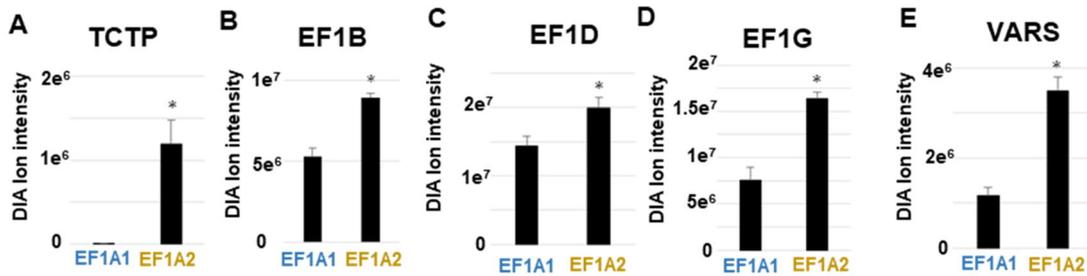


図 2. NF1 腫瘍細胞内における EF1A1 および EF1A2 への TCTP および翻訳伸長因子の結合量の評価。

次に、TCTP の減少によって EF1A2 と翻訳伸長因子 EF1B、EF1D、EF1G、VARS との相互作用にどのような影響を及ぼすか検証した。siRNA を用いて TCTP の発現量を減少させ、SWATH 定量解析により翻訳伸長因子の結合量を評価した結果、EF1B、EF1D、EF1G、VARS の結合量は優位に減少していることが確認された (図 3)。

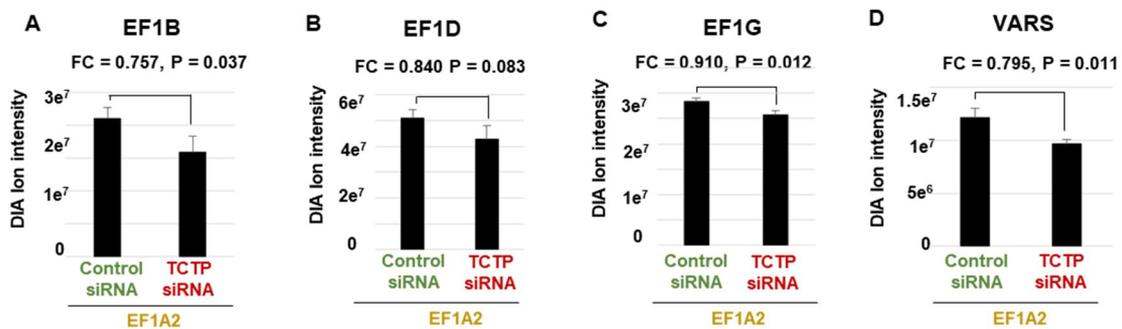


図 3. TCTP をノックダウンした NF1 腫瘍細胞内における EF1A2 への翻訳伸長因子の結合量の評価。

以上の結果より、TCTP は EF1A2 と翻訳伸長因子 EF1B、EF1D、EF1G、VARS との相互作用を媒介して EF1A2 の機能を活性化することが示唆された。

(3)NF1 腫瘍悪性化促進因子 TCTP と特異的に結合する EF1A2 の NF1 腫瘍における機能を検証するために、EF1A1、EF1A2 に特異的な siRNA を設計し、NF1 悪性腫瘍 MPNST 培養細胞、および比較対象としてヒト正常シュワン細胞の EF1A1、EF1A2 の発現を減少させ、SWATH 定量解析による細胞内発現変動タンパク質同定結果を比較した。SWATH 定量解析の全データにより 3001 タンパク質を定量した (図 4 A)。

NF1 悪性腫瘍 MPNST 培養細胞、およびヒト正常シュワン培養細胞内で EF1A1、EF1A2 発現低下によって、発現変動する分子群を抽出し (図 4B, C) Gene Ontology 解析によってそれぞれの機能を分類した (図 4D, E)。

その結果、MPNST 細胞にて EF1A2 ノックダウンによって翻訳に関連

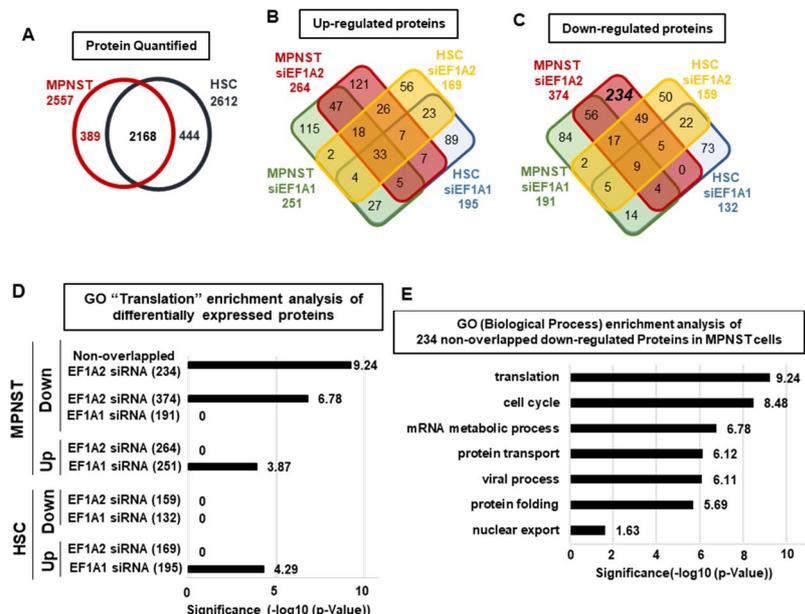


図 4. EF1A1, EF1A2 をノックダウンした NF1 腫瘍細胞、およびヒト正常シュワン細胞内タンパク質の網羅的な発現プロファイリング。

する分子群が特異的に発現低下していることが判明した。この結果を検証するため、EF1A1、EF1A2 の発現を減少させた MPNST 細胞の翻訳活性をメチオニンアナログ L-azidohomoalanine(AHA)を用いた新生タンパク質の検出によって評価した。その結果、EF1A2 をノックダウンした細胞でのみ翻訳活性が低下していた(図 5)。

以上の結果、NF1 腫瘍内において、TCTP は EF1A2 と翻訳伸長因子複合体の相互作用を媒介することで翻訳の活性化に寄与することが示唆された。したがって、NF1 腫瘍の形成において、TCTP-EF1A2 の相互作用を中心としたタンパク質翻訳伸長反応機構は、NF1 腫瘍の悪性化の要因の一つとなっており、TCTP と EF1A2 の相互作用の阻害が、NF1 腫瘍形成を抑制する方法として有効であることが考えられた。

(引用文献)

Hirayama M, Kobayashi D, Mizuguchi S, Morikawa T, Nagayama M, Midorikawa U, Wilson MM, Nambu AN, Yoshizawa A, Kawano S, and Araki N. Integrated proteomics identified a novel activation signaling of dynein IC2-GR-COX-1 in NF1 disease model cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12, 2013, 1377-1394.

Bommer UA, Thiele BJ, The translationally controlled tumour protein (TCTP). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004, 36, 379-385.

Kobayashi D, Hirayama M, Komohara Y, Mizuguchi S, Wilson Morifuji M, Ihn H, Takeya M, Kuramochi A, Araki N. Translationally controlled tumor protein is a novel biological target for neurofibromatosis type 1-associated tumors. *The Journal of Biological Chemistry* 2014, 289, 26314- 26326.

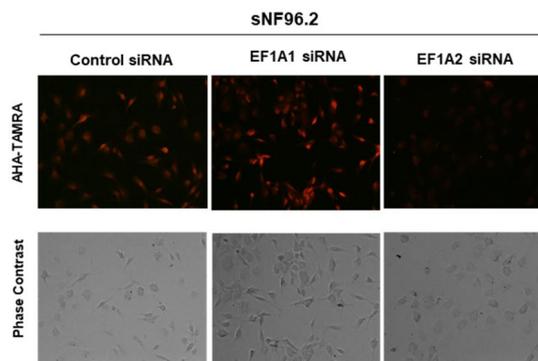


図 5. EF1A1, EF1A2 をノックダウンした NF1 腫瘍細胞の翻訳活性の評価

が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kobayashi Daiki, Tokuda Takaho, Sato Kyosuke, Okanishi Hiroki, Nagayama Megumi, Hirayama-Kurogi Mio, Ohtsuki Sumio, Araki Norie	4. 巻 18
2. 論文標題 Identification of a Specific Translational Machinery via TCTP-EF1A2 Interaction Regulating NF1-associated Tumor Growth by Affinity Purification and Data-independent Mass Spectrometry Acquisition (AP-DIA)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Proteomics	6. 最初と最後の頁 245 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/mcp.RA118.001014	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 Ito Naofumi, Katoh Kaoru, Kushige Hiroko, Saito Yutaka, Umemoto Terumasa, Matsuzaki Yu, Kiyonari Hiroshi, Kobayashi Daiki, Soga Minami, Era Takumi, Araki Norie, Furuta Yasuhide, Suda Toshio, Kida Yasuyuki, Ohta Kunimasa	4. 巻 8
2. 論文標題 Ribosome Incorporation into Somatic Cells Promotes Lineage Transdifferentiation towards Multipotency	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20057-1	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 -
1. 著者名 Okuda S, Watanabe Y, Moriya Y, Kawano S, Yamamoto T, Matsumoto M, Takami T, Kobayashi D, Araki N, Yoshizawa AC, Tabata T, Sugiyama N, Goto S, Ishihama Y.	4. 巻 45
2. 論文標題 jPOSTrepo: an international standard data repository for proteomes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 D1107-D1111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkw1080	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 -
1. 著者名 Kobayashi D, Araki N.	4. 巻 1
2. 論文標題 プロテオミクスデータの細胞生物学的な検証法	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Proteome Letters	6. 最初と最後の頁 37-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 小林大樹、徳田高穂、岡西 広樹、荒木 令江
2. 発表標題 SWATH定量による NF1関連因子TCTP 2 量体型と翻訳伸長因子群の相互作用解析
3. 学会等名 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会2018年合同大会（MSP2018）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林大樹
2. 発表標題 質量分析によるプロテオーム解析
3. 学会等名 第2回・質量分析インフォマティクス・ハッカソン・シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林大樹、徳田高穂、岡西 広樹、大槻 純男、荒木 令江
2. 発表標題 TCTP-EF1A2-翻訳伸長因子複合体を介した神経線維腫症1型腫瘍特異的な翻訳機構の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（Conbio2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林大樹
2. 発表標題 質量分析・プロテオーム
3. 学会等名 第1回・質量分析インフォマティクス・ハッカソン（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daiki Kobayashi, Takaho Tokuda, Hiroki Okanishi, Megumi Nagayama, Sumio Ohtsuki, Norie Araki
2. 発表標題 Identification of TCTP-EF1A2-mediated translation machinery regulating NF1-associated tumor growth by affinity purification and data-independent acquisition.
3. 学会等名 HUPO2017 (16th HUPO World Congress) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林大樹、荒木令江
2. 発表標題 プロテオームデータにある生物学的な重要性を見出すための “ Computational ” ツール
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2017年会 (JHUP02017) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林大樹
2. 発表標題 マルチオミクス解析 (融合プロテオミクス: マルチオミクス解析とデータマイニングの標準化を目指して)
3. 学会等名 第44回BMSコンファレンス (BMS2017) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daiki Kobayashi, Takaho Tokuda, Megumi Nagayama, Kyosuke Sato, Mio Hirayama, Sumio Ohtsuki, Norie Araki
2. 発表標題 Interactome analysis identified a novel binding manner of TCTP-translation elongation factors in Neurofibromatosis type 1 (NF1)-associated tumors.
3. 学会等名 AOHUPO2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Daiki Kobayashi, Takaho Tokuda, Megumi Nagayama, Kyosuke Sato, Sumio Ohtsuki, Norie Araki
2. 発表標題 Interactome analysis identified the specific interaction of TCTP and EF1A2 in Neurofibromatosis type 1 (NF1)-associated tumors
3. 学会等名 HUP02016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小林大樹、徳田高穂、長山慈、佐藤恭介、平山未央、大槻純男、荒木令江
2. 発表標題 Interactome解析によるNF1腫瘍内のTCTP - 翻訳伸長因子複合体の機能解明
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2016年大会 (JHUP0第14回大会)
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----