

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830079

研究課題名(和文) 神経線維腫症1型腫瘍における新規病態関連分子TCTPの機能・役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of functional roles of a novel related protein, TCTP, in NF1 tumors

研究代表者

小林 大樹 (Kobayashi, Daiki)

熊本大学・生命科学研究部・非常勤教員

研究者番号：20448517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経線維腫症1型(NF1)は神経線維腫種や悪性腫瘍をはじめとする、多彩な病態を示す遺伝性疾患であり、その詳細な分子機序、病態マーカー、および治療標的は報告されていない。本研究では、新規NF1関連分子TCTPのNF1腫瘍細胞内での機能を詳細に検討するため、TCTP結合タンパク質群の網羅的な同定を試みた。その結果、TCTPは翻訳、およびストレス応答に関わる因子群と有意に相互作用することが明らかとなった。特に、TCTPは翻訳伸長因子EF1A2との特異的な相互作用によって、NF1腫瘍細胞内のタンパク質合成能を活性化し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と示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant disease that predisposes individuals to developing benign neurofibromas and malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs). Owing to the lack of information on the molecular mechanism of NF1-associated tumor pathogenesis, biomarkers, and therapeutic targets, a radical treatment for NF1 tumors has not been established. To analyze the function of a novel NF1-related protein, TCTP, in detail in NF1-associated tumor, we identified the TCTP-interacting proteins by proteomic approach. As a result, TCTP interacts with proteins related to protein translation machinery and stress. Especially, TCTP specifically interacts with EF1A2, suggesting that the interaction between TCTP and EF1A2 contributes to the formation of NF1-tumor specific translational machinery. Our findings also suggest that the inhibition of TCTP-EF1A2 interaction is a therapeutic target for NF1-associated tumors.

研究分野：総合生物

キーワード：NF1 TCTP プロテオミクス 翻訳伸長因子 EF1A2

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、sequential window acquisition of all theoretical spectra (SWATH) 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、TCTP 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、96 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 ≥ 4 、有意差 95%以上) を同定した (表 1)。

表 1. SWATH 定量解析により同定された TCTP 結合タンパク質 (TCTP/MOCK のイオン強度比: 10 倍以上、有意差 95%以上)

Ratio	p-Value	Name
199.0	0.0666	Translationally-controlled tumor protein
298.2	0.0023	Elongation factor 1-delta
266.8	1E-05	Elongation factor 1-beta
241.3	4E-06	Elongation factor 1-gamma
107.6	0.0234	60S acidic ribosomal protein P0
85.1	0.0052	60S acidic ribosomal protein P2
82.7	0.0279	Elongation factor 1-alpha 2
48.5	0.0096	Valyl-tRNA synthetase
34.2	0.0117	Plasminogen activator inhibitor 2
25.4	0.0475	Eukaryotic initiation factor 4A-II
19.1	0.0116	Elongation factor 1-alpha 1
18.9	0.0358	ADP-ribosylation factor 1
15.1	0.0491	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3
15.0	0.0187	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
14.9	0.0072	60S acidic ribosomal protein P1
14.1	0.012	Cystathionine beta-synthase
12.6	0.041	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
12.2	0.0129	Dihydropyrimidinase-related protein 3
10.6	0.0168	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a
10.5	0.0422	Ras-related protein Rab-1A
10.4	0.0388	Tubulin alpha-1A chain
10.3	0.038	ATP synthase subunit f, mitochondrial
10.1	0.0156	Trans-2,3-enoyl-CoA reductase

(2) 96 種の TCTP 結合タンパク質の機能と分子ネットワークを、分子ネットワークデータベース Keymolnet 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 1A)。特に、タンパク質翻訳に関わる分子には、翻訳伸長因子複合体、リボソームタンパク質群、翻訳開始因子等、ストレス応答に関わるタンパク質には、熱ショックタンパク質群、S100 タンパク質群等が含まれており、これらの分子群と相互作用することで、TCTP は NF1 腫瘍細胞内で、特にタンパク質の合成とストレス応答に関連する機能を有することが考えられた (図 1B)。

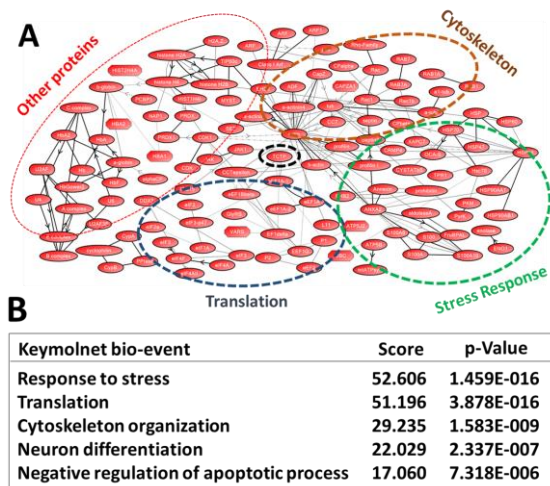


図1. 96種のTCTP結合タンパク質の分子ネットワーク解析(A)と分子機能のオントロジー解析によるTCTPの機能の推定(B)

(3) 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、筋骨格にのみに局限して発現している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、Western Blottingおよび質量分析により細胞内TCTPの結合量を評価した。その結果、EF1A1、EF1A2は、その他の伸長因子複合体構成要素(EF1B、EF1D、EF1G、VARS)とは同等に相互作用している一方で、TCTPとの相互作用は、EF1A2でのみ確認された(図2)。

以上の結果、NF1腫瘍内において、TCTPはEF1A2をコアにした翻訳伸長因子複合体の形成に重要な働きを示すことが示唆された(図3)。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腫瘍に特徴的なタンパク質合成活性化の要因の一つとなっていると予想され、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。

A

Protein ID	Identified peptide number (#)		
	MOCK-FLAG	EF1A1-FLAG	EF1A2-FLAG
EF1A1	17	187	-
EF1A2	0	-	238
TCTP	0	0	15
EF1G	3	40	42
EF1D	2	29	36
EF1B	1	9	14
VARS	0	43	57

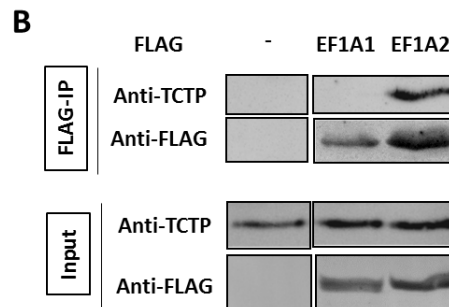


図2. NF1腫瘍細胞内でのEF1A1およびEF1A2とTCTPの結合量の評価。(A) EF1A1-FLAGおよびEF1A2-FLAG融合タンパク質を強制発現させたNF1腫瘍細胞内でEF1A1、およびEF1A2に結合するタンパク質群を質量分析により同定した。結果はそれぞれのタンパク質のIDと同定されたペプチドの数を示す。(B) EF1A1、およびEF1A2に結合するTCTPの量をWestern Blottingによって評価した。

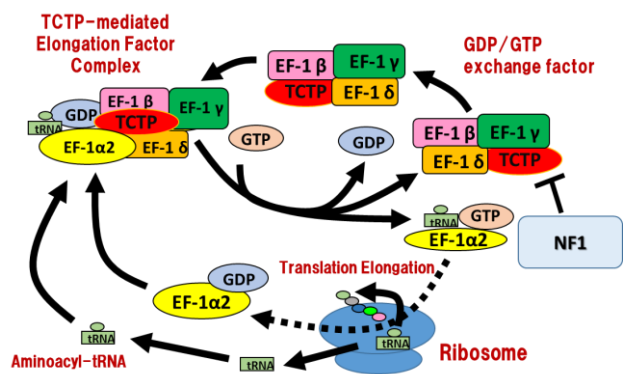


図3. TCTP-EF1A2の相互作用をコアとしたタンパク質翻訳伸長反応機構

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Tokuda K, Kuramitsu Y, Byron B, Kitagawa T, Tokuda N, Kobayashi D, Nagayama M, Araki N, Sonoda KH, Nakamura K. Up-regulation of DRP-3 long isoform during the induction of neural progenitor cells by glutamate treatment

in the ex vivo rat retina. Biochemical and biophysical research communications 2015, 査読有, 463, 593-599.
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.102.

- ② 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, 査読有, 289, 26314-26326.
doi: 10.1074/jbc.M114.568253.

〔学会発表〕(計 23 件)

- ① 小林大樹. プロテオミクスデータの細胞生物学的な検証法. 日本プロテオーム学会 2015 年会. 平成 27 年 7 月 23 日. くまもと新都心プラザ、熊本県熊本市.
- ② 小林大樹, 荒木 令江. 融合プロテオミクスによって同定された神経線維腫症 1 型 (NF1) 新規病態関連因子 TCTP の NF1 腫瘍内における機能と役割. 第 11 回日本臨床プロテオーム研究会. 平成 27 年 5 月 23 日. 国立がん研究センター・国際研究交流会館、東京都中央区.
- ③ 小林大樹, 荒木 令江. 融合プロテオミクス: 新規治療標的分子ネットワーク同定のためのマルチオミクス解析基盤. 平成 26 年 10 月 16 日. 第 87 回日本生化学会. 京都国際会議場、京都府京都市.
- ④ 小林大樹. 融合プロテオミクスによる神経系腫瘍の細胞内特異的タンパク質の解析. 平成 26 年 7 月 18 日. 日本プロテオーム学会 2014 年会. つくば国際会議場、茨城県つくば市.

〔図書〕(計 1 件)

小林大樹, 荒木令江、医歯薬出版株式会社、別冊・医学のあゆみ 臨床プロテオミクス『プロテオーム解析を基盤とした融合的オミクス解析による脳神経系腫瘍の解析』、2015、31-39.

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称: 統合プロテオミクス解析用データ群の生成方法並びに同生成方法にて生成した統合プロテオミクス解析用データ群を用いる統合プロテオミクス解析方法、およびそれを用いた原因物質同定方法

発明者: 荒木令江、水口惣平、森川崇、坪田誠之、小林大樹、倉津純一、ウイルソン政代
権利者: 国立大学法人熊本大学

種類: 特許

番号: 特許第 5822309 号

取得年月日: 2015 年 10 月 16 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 大樹 (Kobayashi Daiki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・研究員

研究者番号: 20448517