

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10579

研究課題名(和文) ミトコンドリア内分子シャペロンを標的とした尿路上皮癌に対する新規癌治療戦略

研究課題名(英文) Development of a new treatment strategy to target mitochondrial chaperones in urothelial carcinoma

研究代表者

吉田 宗一郎 (YOSHIDA, Soichiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80383280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア内の呼吸鎖反応を抑制管理している分子シャペロンであるTumor necrosis receptor-associated protein 1 (TRAP1)のチロシンリン酸化による機能調節メカニズムについて検討を行なった。質量分析にて、TRAP1のY498残基をリン酸化残基候補として同定。TRAP1-Y498Fでは、野生型TRAP1と比較して、cSrcによるリン酸化の程度が減少していた。一方、野生型TRAP1と比較し、TRAP1-Y498F及び-Y498EのATP結合能に明らかな違いはなく、498番目のチロシン残基リン酸化は、TRAP1のATP結合能に影響が小さいと示唆された。

研究成果の概要(英文)：TRAP1 (TNF receptor-associated protein), a homologue of HSP90, is mitochondrial molecular chaperone which regulates a metabolic switch between mitochondrial respiration and aerobic glycolysis. We explored the possibility that TRAP1 phosphorylation regulates its chaperone activity. We identified Y498 as a possible tyrosine phosphorylated residue, and found attenuation of c-Src mediated phosphorylation in TRAP1 with non-phosphomimetic mutation of this residue, while there was no significant difference in the ATP binding activity between the wild type, and phospho- or non-phosphomimetic mutation TRAP1.

研究分野：癌化学放射線療法治療耐性克服

キーワード：分子シャペロン ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

これまで、申請者は、ミトコンドリア内のみ局在する分子シャペロンである Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1)は、cSrc との結合により、呼吸鎖の Complex IV の活性を抑制的に制御しており、酸化的リン酸化の抑制による、ATP 産生抑制および活性酸素産生制御を介して、細胞の移動能を制御していることを見出してきた¹。TRAP1 は細胞内での酸化的リン酸化と解糖のバランスを司っているものと解釈される。

TRAP1 と構造的相同性の高い paralogue である、Heat shock protein 90 (Hsp90)は、ATP の結合と ATP 加水分解による立体構造の変化により制御されているが、リン酸化を含む翻訳後修飾が Hsp90 の分子シャペロン活性の制御に重要であることが解明されてきた。TRAP1 も Hsp90 同様に、チロシンリン酸化蛋白であるため、翻訳後修飾が機能調節に重要であることが推測され、翻訳後修飾を変化させることで、TRAP1 の活性化を誘導する癌治療戦略となる可能性がある。

2. 研究の目的

切除不能な腎盂尿管癌、および膀胱癌に対する治療法は未だ有効でなく、新規の治療戦略の樹立が期待されている。TRAP1 はミトコンドリア内の分子シャペロンとして、呼吸鎖反応を抑制管理しているという申請者の知見に基づき、TRAP1 を標的とした尿路上皮癌に対する新規治療戦略を樹立するべく、本研究では、TRAP1 のチロシンリン酸化による機能調節メカニズムを明らかにすることを目標とした。

1)TRAP1 をリン酸化させるチロシンキナー

ゼ及びチロシンリン酸化をきたす残基を同定する。

2)TRAP1 のチロシンリン酸化による翻訳後修飾での TRAP1 の機能制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1)TRAP1 のチロシンリン酸化残基同定について：

TRAP1 のリン酸化部位候補の絞り込みを質量分析により行う。同定されたリン酸化候補部位のリン酸化を、精製蛋白を使用した in vitro kinase assay にて評価を行うとともに、リン酸化が細胞内で起きていることを確認する。

2)TRAP1 の翻訳後修飾による機能調節機構の評価について：

免疫沈降法により、TRAP1 と結合しているチロシンキナーゼをスクリーニングし、候補となるチロシンキナーゼによる TRAP1 のリン酸化の変化を評価する。

さらに、非リン酸化型およびリン酸化型を模倣した変異型 TRAP1 を作成し、機能的評価を行う。

4. 研究成果

TRAP1 の翻訳後修飾による機能調節機構の評価について

リン酸化候補部位の絞り込み：

過剰発現させた TRAP1 を免疫沈降させ、質量分析し、498 番目のチロシン残基をリン酸化部位候補として同定した。

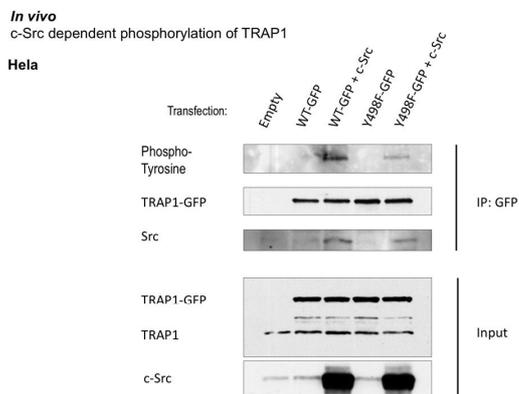
リン酸キナーゼ候補の絞り込み：

過剰発現させた TRAP1 を免疫沈降させ、

TRAP1 と結合しているチロシンリン酸化キナーゼのスクリーニングを行なったところ、すでに同定していた c-Src に加え、c-Abl が TRAP1 と結合していることを確認した。

498 番目のチロシン残基の細胞内リン酸化の確認：

TRAP1 の 498 番目のチロシン残基に変異を導入し、非リン酸化型に模倣した変異である TRAP1-Y498F と TRAP1-Y498E を作成、リン酸化の評価を行った。その結果、TRAP1-Y498F では、野生型 TRAP1 と比較して、cSrc によるリン酸化の程度が減少していることを見出した。



Hela細胞に非リン酸化型に模倣した変異であるTRAP1-Y498Fを作成、チロシンリン酸化の程度を評価。TRAP1-Y498Fでは、野生型TRAP1と比較して、cSrcによるリン酸化の程度が減少している。

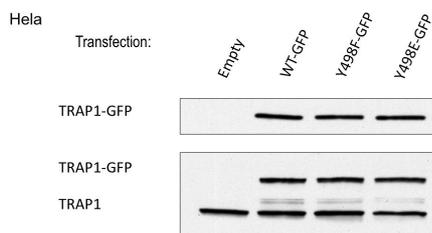
In vitro kinase assay による TRAP1 蛋白のチロシンリン酸化確認：

野生型 TRAP1 および TRAP1-Y498F のタンパク生成を行い、精製 TRAP1 蛋白の c-Src によるリン酸化の変化を in vitro kinase assay により評価したが、c-Src によるリン酸化は野生型および Y498F 変異型共に得られなかった。

翻訳後修飾による機能調節の評価について：

野生型 TRAP1 とともに、TRAP1-Y498F と TRAP1-Y498E を過剰発現させ、ATP ビーズを使用した免疫沈降を施行し、ATP 結合能を評価したところ、TRAP1 の ATP 結合能は野生型、Y498E、Y498F とともに変化が認められなかった。そのため、498 番目のチロシン残基のリン酸化は、TRAP1 の ATP 結合能に影響が少ないものと考えられた。

The ATP binding of TRAP1



Hela細胞に非リン酸化型とリン酸化型を模倣した変異であるTRAP1-Y498FとTRAP1-Y498EのATP結合能を評価。TRAP1-Y498FとTRAP1-Y498EのATP結合能は、野生型TRAP1と比較して、変化がない。

Cyclophilin D との結合調節機能について：

アポトーシス時のミトコンドリア外膜透過性亢進の分子機構の一貫であるミトコンドリア膜透過性遷移現象に必須である Cyclophilin D と TRAP1 は結合体を形成し、その機能に関与しているとされている²。そのため、TRAP1 と CyclophilinD の結合における 498 番目のチロシン残基のリン酸化の影響について評価を行なったが、TRAP1 と CyclophilinD との結合能は、野生型、Y498E、Y498F とともにあきらかな変化が認められなかった。

<参考文献>

Molecular chaperone TRAP1 regulates a metabolic switch between mitochondrial respiration and aerobic glycolysis. Yoshida S, Tsutsumi S, Muhlebach G, et al.

Proc Natl Acad Sci U S A.110: E1604-12,
2013. doi: 10.1073/pnas.1220659110.

Regulation of tumor cell mitochondrial
homeostasis by an organelle-specific
Hsp90 chaperone network. Kang BH, Plescia
J, Dohi T, Rosa J, Doxsey SJ, Altieri DC.
Cell. 131:257-70, 2007. doi:
10.1016/j.cell.2007.08.028

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 宗一郎 (YOSHIDA, Soichiro)

東京医科歯科大学、大学院医歯学総合研究科、
助教

研究者番号： 80383280

(2)研究分担者

小野 竜一 (ONO, Ryuichi)

国立医薬品食品衛生研究所、毒性部、室長
研究者番号： 10401358

齋藤 一隆 (SAITO, Kazutaka)

東京医科歯科大学、医学部附属病院、准教授
研究者番号： 10422495

藤井 靖久 (FUJII, Yasuhisa)

東京医科歯科大学、大学院医歯学総合研究科、
教授

研究者番号： 70282754