

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07691

研究課題名（和文）TCTP-EF1A2による翻訳制御を標的としたNF1腫瘍化機構の解析と治療法開発

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of tumorigenesis related to Neurofibromatosis type-1 and development of their therapeutic strategies targeting translation regulation by TCTP-EF1A2

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） 3,300,000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および治療法の開発を目的として、EF1A2を含む翻訳伸長因子複合体におけるTCTPの機能を検討した。TCTPと結合するタンパク質の結合部位をクロスリンク質量分析法により解析した結果、TCTPのEF1A2への結合部位は、EF1A2とその活性化因子との結合部位の近傍であることが判明した。これらの情報を基に、TCTPとNF1腫瘍特異的な翻訳伸長因子群の結合を阻害する薬剤を選択的に用いる治療法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、TCTP-EF1A2を介した神経線維腫症1型（NF1）腫瘍の悪性化メカニズムの理解を深めることに成功し、これらの情報を基にTCTPとEF1A2を中心としたNF1腫瘍特異的な翻訳伸長因子群の結合を阻害する薬剤をスクリーニングすることによって、NF1腫瘍のより効果的な治療法の開発が期待される。したがって本研究成果は、NF1腫瘍のメカニズム解明と治療法の開発に向けた重要な一歩であり、学術的にも社会的にも大きな意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Previous studies have demonstrated that the expression of translationally regulated tumor protein (TCTP) is elevated in neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor cells and that TCTP contributes to NF1 tumor malignancy through its interaction with a group of translation elongation factors, mainly EF1A2. In this study, the binding sites of TCTP- and EF1A2-interacting proteins were analyzed by crosslinking mass spectrometry. As a result, it has been found that the binding site of TCTP to EF1A2 is located near the binding site of EF1A2 and its activators. Based on these information, it has been expected that therapies using selective drugs that inhibit the binding of TCTP to a group of NF1 tumor-specific translation elongation factors have been developed.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：神経線維腫1型 MPNST TCTP EF1A2 クロスリンク質量分析

### 1. 研究開始当初の背景

神経線維腫症 型 (NF1) は 3000 人に 1 人の割合で発症する遺伝性疾患で、多発性神経線維腫や悪性腫瘍などの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、原がん遺伝子産物 Ras の活性を抑制する機能を有し、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。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。また、TCTP の NF1 腫瘍内における分子機能と生物学的役割を詳細に解析した結果、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明らかとなった。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。

### 2. 研究の目的

TCTP と EF1A2 を中心とした翻訳伸長因子複合体を標的とした NF1 腫瘍の新規治療法の開発を目指し、本研究では、TCTP-EF1A2 を含む複合体の相互作用形式を詳細に解析し、薬剤などを用いて TCTP-EF1A2 を含む複合体が有する機能を阻害するための情報を取得した。

### 3. 研究の方法

(1) HeLa 細胞に FLAG タグ付きの TCTP、EF1A1、EF1A2 それぞれ発現するプラスミドをトランスフェクションし、細胞内に過剰発現させた。それぞれの細胞からタンパク質を抽出し、抗 FLAG 抗体により免疫沈降を行い、クロスリンカーとして Disuccinimidyl Sulfoxide (DSSO) を用いて各 FLAG 融合タンパク質と特異的に結合する分子群を架橋し、トリプシン消化の後に LC/MS 解析 (XlinkX 法) (図 1) を行った。

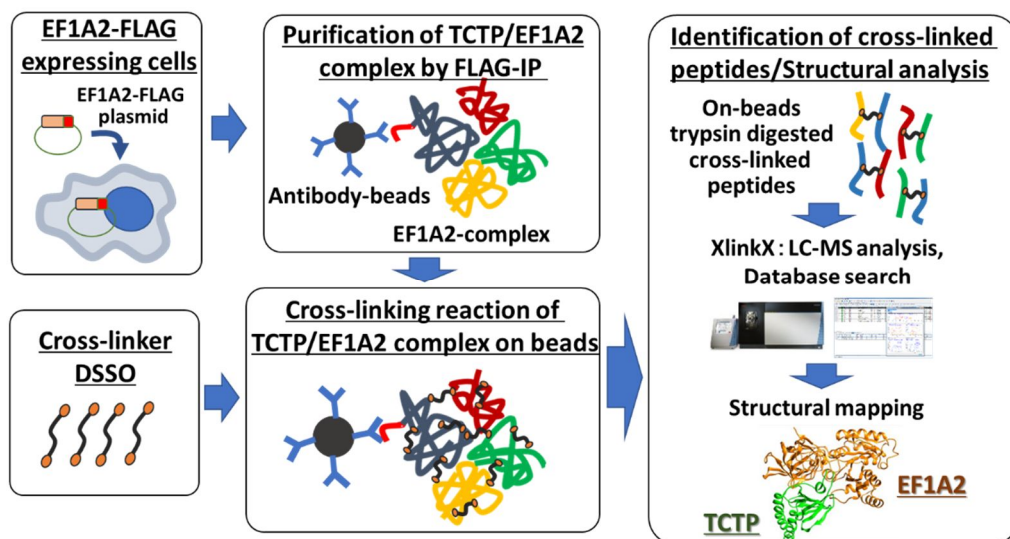


図 1 | TCTP-EF1A2 複合体の相互作用形式の解析手法.

### 4. 研究成果

TCTP、EF1A1、EF1A2 を発現するプラスミドをトランスフェクションした HeLa 細胞より調製したサンプルから、それぞれ 76、123、140 個のクロスリンクペプチドが同定された (FDR < 1%か

$\alpha$  (EF1A2\_D31-K44-R46):DLISHDEMFSDIYKIR

|DSSO

$\beta$  (TCTP\_F17-K19-K26):

FEKEAAEMGK

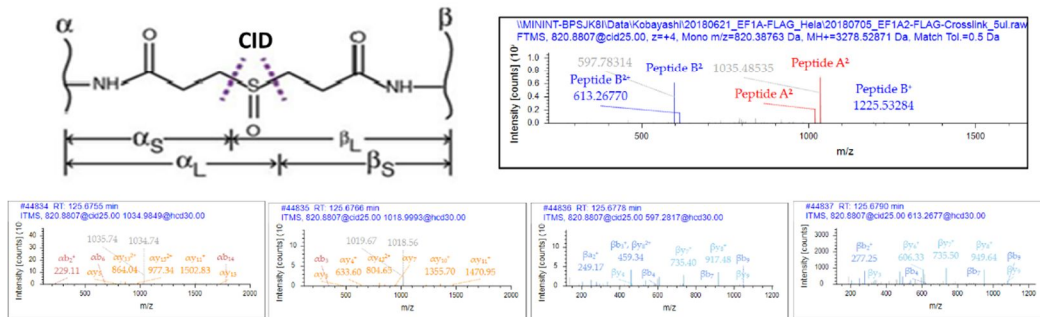


図 2 | TCTP-EF1A2 相互作用部位の同定結果. XlinkX 法により同定された TCTP の K19 と EF1A2 の K44 のクロスリンクペプチドのスペクトル情報を示す。

つ XlinkX スコア 20)。特に、TCTP の シート内の K19 と EF1A2 の ヘリックス内の K41 が DSSO によりクロスリンクされていることが明らかとなった (図 2)。このクロスリンクペプチドは、EF1A1 を発現させて調製したサンプルにおいては同定されなかったことから、TCTP が EF1A2 とこの部位で特異的に相互作用していることが考えられた。EF1A2 は二量体を形成することによってその機能を制御していると考えられており、特に EF1A2 の二量体化は翻訳活性とは別の機能を発揮するための構造であることが示唆されている。我々は TCTP が EF1A2 の二量体化を阻害し、EF1A2 の翻訳機能を活性化することを示唆するデータを示した。今回同定した TCTP と EF1A2 の相互作用部位は、EF1A2 の二量体化の接触面に位置していることから、TCTP が構造学的に EF1A2 の二量体化を阻害していることが考えられた。また、EF1A1 や EF1A2 の GEF として機能する EF1B、EF1D、および EF1G は、EF1A2 の K41、および K154 とクロスリンクしていることが明らかとなった。さらに、EF1A2 の GDP/GTP 結合部位近傍で、GEF 複合体と EF1A2 が相互作用していることが本研究の実験結果から得られ、TCTP もその近傍で EF1A2 と相互作用していることから、EF1A2 の GTP 結合領域で翻訳伸長因子群との複合体の形成を媒介することで、TCTP は EF1A2 の活性化に寄与することが考えられた (図 3)。

以上の結果より、TCTP は、EF1A2 のホモ二量体構造を形成する部位と拮抗的に結合し、EF1A2 の二量体化を阻害することで、EF1A2 の翻訳機能を活性化することが考えられた。また、EF1A2 の GTP 結合領域で翻訳伸長因子群との複合体の形成を媒介することで、TCTP は EF1A2 の活性化に寄与することが示唆された。これらの情報をもとに、TCTP と NF1 腫瘍特異的な翻訳伸長因子群の立体構造形成を阻害するような薬剤を選択的に用いることで、NF1 に関連する腫瘍の治療の開発に応用できることが期待される。

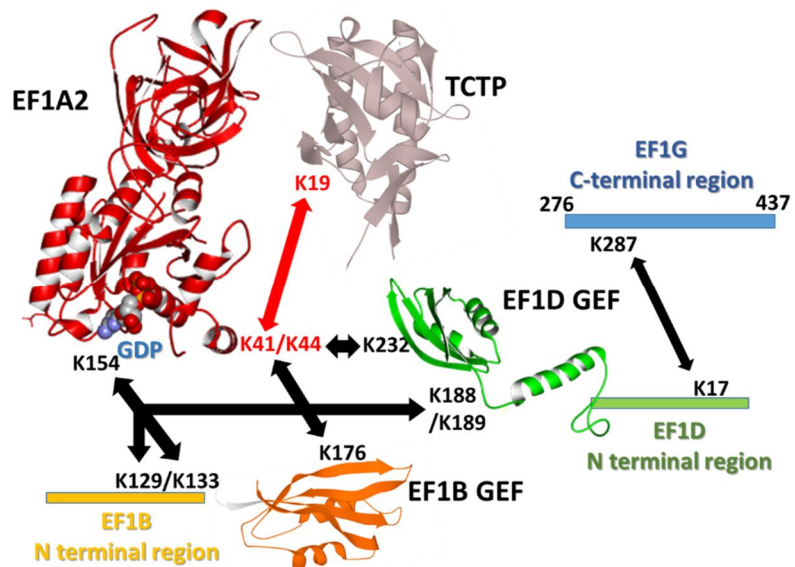


図 3 | TCTP-EF1A2 を含む翻訳伸長因子複合体の相互作用部位の同定. TCTP と EF1A2 の相互作用部位が、EF1A2 の GDP/GTP、GEF 複合体 (EF1B、EF1D、EF1G) との相互作用部位の近傍に位置することを示す。各構造は以下の PDB より取得した。TCTP: 1y21, EF1A2: 4c0s, EF1B: 1B64, EF1D: 2N51

#### (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 2013, 12, 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.

Kobayashi D, Tokuda T, Sato K, Okanishi H, Nagayama M, Hirayama-Kurogi M, Ohtsuki S, Araki N. 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). Molecular & Cellular Proteomics 2019, 18, 245-262.

Liu F, Lössl P, Scheltema R, Viner R, Heck AJR. Optimized fragmentation schemes and data analysis strategies for proteome-wide cross-link identification. Nature Communications 2017, 8, 15473.

Carriles AA, Mills A, Muñoz-Alonso MJ, Gutiérrez D, Domínguez JM, Hermoso JA, Gago F. Structural Cues for Understanding eEF1A2 Moonlighting. ChemBioChem 2021, 22, 374-391.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Daiki Kobayashi, Norie Araki	4. 巻 3
2. 論文標題 TCTP interactomics in NF1-associated malignant tumor cells by affinity-purification and SWATH-MS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Data and Methods	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14889/jpdm.2021.0002	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 該当する

1. 著者名 Daiki Kobayashi, Norie Araki	4. 巻 2
2. 論文標題 Data for quantitative proteome analyses of NF1-deficient PC12 cells during NGF induced neural differentiation using iTRAQ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Data and Methods	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14889/jpdm.2020.0002	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林 大樹
2. 発表標題 がん細胞特異的タンパク質の機能解明を目指したプロテオーム解析
3. 学会等名 第20回北里プロテオーム研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荒木 令江, 小林 大樹
2. 発表標題 統合オミクス解析による神経線維腫症 1 型に関連する腫瘍の新規治療ターゲットシグナルの同定と機能解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 大樹
2. 発表標題 プロテオミクスによる神経系腫瘍細胞内タンパク質の動態解析：発現プロファイルから機能解析まで
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木 令江, 小林 大樹
2. 発表標題 NF1腫瘍の新規治療ターゲットシグナルの同定と機能解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 大樹, 荒木 令江
2. 発表標題 インフォマティクスに支えられるプロテオーム解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椋木 浩太, 小林 大樹, 徳田 高穂, 荒木 令江
2. 発表標題 クロスリンキング質量分析（XL-MS）によるNF1関連病態因子TCTPと翻訳伸長因子群の相互作用形式の解明
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daiki Kobayashi, Kota Mukugi, Takaho Tokuda, Norie Araki
2. 発表標題 Analysis of the interaction between NF1-associated factor TCTP and translation elongation factors by cross-linking mass spectrometry coupled with affinity purification
3. 学会等名 2019 HUP0 World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	荒木 令江  (Araki Norie)  (80253722)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授    (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------