

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590364

研究課題名(和文) 癌の治療標的としてのMnk-eIF4E経路に関する研究

研究課題名(英文) Targeting Mnk/eIF4E pathway for cancer therapy

研究代表者

上田 健 (Ueda, Takeshi)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：60585149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはこれまでにマウスモデル並びにヒト細胞株を用いた異種移植モデルによって、セリン・スレオニンキナーゼMnk1とMnk2が、mRNAのキャップ依存的翻訳開始に必須の翻訳因子eIF4Eをリン酸化して癌を促進することを明らかにした。本研究では、さらにMnk-eIF4E経路と相互作用する新規タンパク質群を同定し、この経路に関与する新たな活性制御機構を探索することを目的とし、エピトープタグ発現精製法および質量分析法を用いて、Mnk1の相互作用タンパク質群の検索と機能解析をこころみた。結果、新規Mnk1結合タンパク質のひとつとして、分子量約130kDaの脱ユビキチン化酵素を同定した。

研究成果の概要(英文)：MAP kinase-interacting kinase 1 (Mnk1) and Mnk2 are protein-serine/threonine kinases that are activated by ERK or p38 and phosphorylate a translation initiation factor eIF4E. We have previously reported that Mnk1/2 double deficiency delays tumor development in a mouse lymphoma model and that suppression of Mnk1 significantly reduces the tumorigenic activity of xenografted human glioma cells. To further investigate the regulatory network of Mnks, we attempted to search for Mnk1-interacting proteins. The Flag-tagged wild-type Mnk1 and kinase-dead Mnk1 complexes were affinity-purified from mouse embryonic fibroblasts, and then the identities of binding proteins were determined by tandem mass spectrometry. As a result, a 130kDa deubiquitinase was identified as a novel Mnk1-binding partner. We are currently exploring the impact of the interaction between these proteins.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1)セリン・スレオニンキナーゼ Mnk1 と Mnk2 は、酵素活性部位に関して約 90%の類似性を示すファミリー遺伝子であり、mRNA のキャップ依存的翻訳開始に必須である翻訳因子 eIF4E をリン酸化して蛋白合成制御に関与することが示唆されている。申請者らは以前にヒト Mnk1 を同定し、Mnk1 が MAP キナーゼによってリン酸化を受け活性化されるセリン・スレオニンキナーゼであることを明らかにした (Fukunaga et al. EMBO J 1997)。また Mnk1/Mnk2 の二重欠損マウスを作製して、二重欠損マウス由来の細胞では eIF4E のリン酸化が完全に消失していることを見出し、Mnk1 と Mnk2 が生体において、eIF4E のリン酸化を担う唯一のプロテインキナーゼであることを明らかにした (Ueda et al. Mol Cell Biol. 2004)。

(2)T 細胞特異的 Pten 欠損マウスでは、PI3K-Akt 経路が恒常的に活性化し全例がリンパ腫を発症する。eIF4E は PI3K-Akt 経路の下流で癌の進展に寄与するエフェクター分子のひとつとして機能することが知られている。申請者らは T 細胞特異的 Pten 欠損マウスのリンパ腫組織では eIF4E のリン酸化レベルが著明に上昇していることを見出した。一方で、このマウスからさらに Mnk1/2 を二重欠損させた個体由来のリンパ腫では、eIF4E のリン酸化が検出されず、同時にリンパ腫の進展が有意に遅延することを明らかにした。さらに Pten の機能欠失型変異を有するヒト神経膠腫細胞株を用いたヌードマウスへの異種移植実験により、Mnk1 の発現抑制が癌の進展を阻害することを明らかにし、Mnk 阻害剤が新規がん治療薬となる可能性を示した (Ueda et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010)。

2. 研究の目的

Mnk の二重欠損はマウス個体発生には影響を及ぼさないため、Mnk 特異的阻害剤は副作用の少ない癌治療薬になる可能性がある。一方で、上記の背景および、これまでの研究成果より、Mnk-eIF4E 経路に相互作用し活性制御する新規タンパク質群もまた、新たながん治療の標的になりうると考えられる。その基盤となる研究を行う。
Mnk-eIF4E 経路に相互作用しうる新規タンパク質群を同定し、相互作用の細胞生物学的な機能的意義づけを行う。

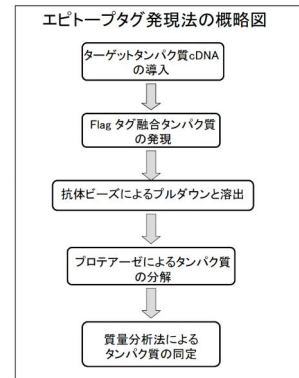
3. 研究の方法

(1)タンパク質の機能解析を行う場合、そのタンパク質がどのようなタンパク質と結合するかは、生体内におけるタンパク質の機能および活性制御機構を理解する上で必要不可欠である。エピトープタグ発現精製法は、目的タンパク質を、タグとして用いるエピトープペプチドとの融合タンパク質として細胞内に発現させ、目的のタンパク質と結合するタンパク質成分を、細胞抽出液からタグを利用して複合体として回収する。回収には抗

エピトープ抗体を不溶化したビーズが利用できるため、汎用性が高く、タンパク質の相互作用解析に有用である。タンパク質の相互作用を解析する手段として広く用いられている。

Mnk1 と Mnk2 蛋白質は、全体で 70%以上、リン酸化酵素活性部位について約 90%のアミノ酸相同性を有し、それぞれ類似した構造をもつ蛋白質と結合することが予想された。そこで

本法を用いた Mnk の新規活性化制御機構に関する相互作用タンパク質の探索として、まず Mnk1 結合タンパク質の探索を行うこととした。



(2)Flag ペプチド配列が結合したマウス Mnk1 タンパク質の野性型あるいは機能欠失型変異体(マウス Mnk1 の 197 番目と 202 番目のスレオニン残基をアラニンに置換した変異体)をコードする cDNA、をレトロウイルスの手法を用いて Mnk1 遺伝子欠損マウス由来の不死化線維芽細胞に発現させ、薬剤選択によって、これらタンパク質が恒常的に発現した細胞株を樹立した。

(3)それぞれの細胞株より細胞抽出液を得た後、Flag-Mnk1 結合蛋白質複合体を抗 FlagM2 抗体アガロースアフィニティゲルを用いて免疫沈降により得る。最終精製物(蛋白質複合体)を SDS-PAGE で分離後、ゲルよりタンパクの抽出、精製を行い、プロテアーゼ(トリプシン)処理後に質量分析法を用いて含まれるペプチドのアミノ酸配列を特定する。異なるペプチド配列の数を Mock infection した細胞と比較した。

4. 研究成果

(1)上記の研究方法にしたがい Mnk1 相互作用タンパク質の同定を試みた。野性型 Mnk1, 機能欠失型 Mnk1 変異体のいずれか一方で 8 つ以上の異なるペプチド断片が検出され、かつ Mock では、2 つ以下のバックグラウンドレベルでしか検出されなかったタンパク質を有意な相互作用の判定基準としたところ、15 種類の異なる相互作用タンパク質が同定された。

(2)Mnk1 のリン酸化酵素のひとつ p38α が野性型 Mnk1, 機能欠失型 Mnk1 双方の相互作用タンパク質として含まれていた。また、これまでに Mnk1 は、翻訳開始因子複体の構

成因子 eIF4G と結合することが知られているが、eIF4G ならびに、eIF4G を含む翻訳開始因子複合体の他の構成因子(eIF4E, eIF3 複合体構成因子群)も、野性型、変異 Mnk1 共通の相互作用タンパク質として同定された。これら既知の Mnk1 相互作用関連タンパク質群と考えられるものが約 80%を占めており、本アッセイは、結合タンパク質スクリーニングとして機能していると考えた。

(3)同定された新規結合タンパク質のひとつとして、分子量約 130kDa の脱ユビキチン化酵素に着目した。このタンパク質は p53 の阻害因子である MDM2 ならびに PTEN を基質として、タンパク質の安定性や局在制御に関与し、腫瘍の進展に関わることが指摘されている。また、セリン残基がリン酸化を受けると核-細胞質局在が変わることが知られている。Mnk1 ノックアウトマウス由来の繊維芽細胞に発現させた Flag-mouse Mnk1 が、内在性のこの新規結合タンパク質と相互作用することを免疫沈降により確認した。また、ヒト培養細胞株に両タンパク質のヒトホモログを過剰発現させた場合にも両者の相互作用が認められた。これら相互作用は、Mnk1 のリン酸化酵素活性を欠いた変異体においても同様に観察された。この新規タンパク質を野性型と Mnk1/Mnk2 ノックアウトマウス繊維芽細胞それぞれに過剰発現させて、細胞レベルでの機能的関連について検討を行った。通常培養条件下においては両者の細胞増殖には明らかな違いが認められなかったため、現在ストレス下での細胞応答に関して、これら分子の相互作用が細胞機能に与える影響の解析をすすめている。

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 12 件)

Chevillard-Briet M, Quaranta M, Grézy A, Mattera L, Courilleau C, Philippe M, Mercier P, Corpet D, Lough J, Ueda T, Fukunaga R, Trouche D, Escaffit F. Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through Wnt signaling. *Hum Mol Genet.* 査読有 2014;23(8):2120-2131.

Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda Z, Takubo K, Suda T, Oda H, Inaba T, Honda H. Acquired deficiency of a20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function. *PLoS One.* 査読有 2014;9(1):e87425.

Berger T, Ueda T, Arpaia E, Chio II,

Shirdel EA, Jurisica I, Hamada K, You-Ten A, Haight J, Wakeham A, Cheung CC, Mak TW. Flotillin-2 deficiency leads to reduced lung metastases in a mouse breast cancer model. *Oncogene.* 査読有 2013; 32(41):4989-4994.

Inoue S, Hao Z, Elia AJ, Cescon D, Zhou L, Silvester J, Snow B, Harris IS, Sasaki M, Li WY, Itsumi M, Yamamoto K, Ueda T, Dominguez-Brauer C, Gorrini C, Chio II, Haight J, You-Ten A, McCracken S, Wakeham A, Ghazarian D, Penn LJ, Melino G, Mak TW. Mule/Huwei1/Arf-BP1 suppresses Ras-driven tumorigenesis by preventing c-Myc/Miz1-mediated down-regulation of p21 and p15. *Genes Dev.* 査読有 2013;27(10):1101-1114.

Nishibe R, Watanabe W, Ueda T, Yamasaki N, Koller R, Wolff L, Honda Z, Ohtsubo M, Honda H. CIZ1, a p21 (Cip1/Waf1)-interacting protein, functions as a tumor suppressor in vivo. *FEBS Lett.* 査読有 2013;587(10):1529-1535.

Gorentla BK, Krishna S., Shin J., Inoue M., Shinohara ML, Grayson JM, Fukunaga R, Zhong XP. Mnk1 and 2 are dispensable for T cell development and activation but important for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 査読有 2013;190(3):1026-1037.

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 2013;32(2):190-197.

Sharma B, Joshi S, Sassano A, Majchrzak B, Kaur S, Aggarwal P, Nabet B, Bulic M, Stein BL, McMahon B, Baker DP, Fukunaga R, Altman JK, Licht JD, Fish EN, Plataniias LC. Sprouty proteins are negative regulators of interferon (IFN)-signaling and IFN-inducible biological responses. *J Biol Chem.* 査読有 2012; 287(50):42352-42360.

Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda ZI, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H. EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms." *Leukemia.* 査読有 2012;26(12):2557-60.

Sasaki M, Knobbe CB, Itsumi M, Elia AJ, Harris IS, Chio II, Cairns RA, McCracken

S, Wakeham A, Haight J, Ten AY, Snow B, Ueda T, Inoue S, Yamamoto K, Ko M, Rao A, Yen KE, Su SM, Mak TW. D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. *Genes Dev.* 査読有 2012;26(18):2038-2049.

Chio II, Sasaki M, Ghazarian D, Moreno J, Done S, Ueda T, Inoue S, Chang YL, Chen NJ, Mak TW. TRADD contributes to tumour suppression by regulating ULF-dependent p19(Arf) ubiquitylation. *Nat Cell Biol.* 査読有 2012;14(6):625-633.

Joshi S, Sharma B, Kaur S, Majchrzak B, Ueda T, Fukunaga R, Verma AK, Fish EN, Plataniias LC. Essential role for Mnk kinases in type II interferon (IFN $\{\gamma\}$) signaling and its suppressive effects on normal hematopoiesis. *J Biol Chem.* 査読有 2011;286(8):6017-6026

〔学会発表〕(計5件)

上田健、福永理己郎、Roumiana Alexandrova、Theo Goh、Tak W. Mak、本田浩章
Identification of interacting partners for MAP kinase-interacting kinase 1、第86回日本生化学会 2013.9.11 横浜

上田健、真田昌、松井啓隆、山崎憲政、本田善一郎、森啓、LEE-YUNG SHIH、稲葉俊哉、小川誠司、本田浩章
遺伝子改変マウスを用いた造血器腫瘍関連 EED Ile363Met 変異体の解析、第75回日本血液学会 2013.10.12 札幌

上田健、真田昌、松井啓隆、山崎憲政、本田善一郎、森啓、LEE-YUNG SHIH、稲葉俊哉、小川誠司、本田浩章
MDSで同定されたポリコーム複合体 PRC2 構成因子 EED の機能欠失型変異体の解析、第74回日本血液学会 2012.10.19 京都

上田健、真田昌、松井啓隆、山崎憲政、本田善一郎、森啓、LEE-YUNG SHIH、稲葉俊哉、小川誠司、本田浩章
骨髄異形成症候群におけるポリコーム複合体 PRC2 構成因子 EED の機能欠失型変異、第73回日本血液学会 2011.10.15 名古屋

上田 健
癌の治療標的としての Mnk/eIF4E 経路、第84回日本生化学会大会 2011.9.22 京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 健 (UEDA, Takeshi)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：60585149

(2)研究分担者

本田 浩章 (HONDA, Hiroaki)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：40245064

福永 理己郎 (FUKUNAGA, Rikiro)
大阪薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：40189965