

平成24年4月23日提出

対象研究テーマ：がん化シグナル伝達系における足場タンパク質 JSAP の役割とその分子機構

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：がん細胞の増殖における Mnk プロテインキナーゼと JSAP の機能的相互作用の解析

研究代表者：大阪薬科大学薬学部 教授 福永理己郎

研究成果の概要：

ERK および p38 MAP キナーゼによって活性化される Mnk プロテインキナーゼは、翻訳開始因子 eIF4E のリン酸化などを介して翻訳制御に関与すると考えられている。Mnk1/2- DKO マウスから樹立した MEF 細胞に Mnk1 を発現させ、翻訳制御における mTOR シグナル系と Mnk シグナル系のクロストークについて解析した。その結果、mTOR シグナル系の活性化による eIF4G (Ser1108) のリン酸化が Mnk1 シグナル系によって阻害あるいは修飾されることを見出した。これはリン酸化 Ser1108 残基の脱リン酸化ではなく、Ser1105/1106 のリン酸化による可能性が示唆された。他方、Mnk1 の構成的活性化変異体が、標的タンパク質である eIF4E と比較的安定な複合体を形成することを見出し、これを基質トラップ変異体として標的タンパク質の探索に利用できる可能性が示唆された。

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：プロテインキナーゼ，足場タンパク質，翻訳制御

## 1. 研究開始当初の背景

Mnk1 及び Mnk2 は、MAP キナーゼによって活性化されるセリン/スレオニン・プロテインキナーゼであり、翻訳開始因子 4E (eIF4E: mRNA キャップ結合蛋白質) をリン酸化することにより、一群の mRNA の翻訳開始を制御すると考えられている。研究代表者は、Mnk1/Mnk2 ノックアウトマウスを作製することにより、Mnk が生体内でも ERK や p38MAP キナーゼによって活性化されて eIF4E のリン酸化を担うことを明らかにした。翻訳開始の律速因子である eIF4E は多くの悪性腫瘍で過剰発現しており、細胞のがん化に伴うタンパク合成促進に重要な役割を果たしている。eIF4E の活性は主に mTOR と Mnk の 2 つのプロテインキナーゼ経路で制御されることが近年明らかにされた。mTOR は PI3K の下流で活性化され、eIF4E 阻害因子である 4E-BP をリン酸化して不活化することによって翻訳開始複合体形成を促進し、一方、Mnk は eIF4E を直接リン酸化して mRNA の選択的翻訳に機能すると考えられている。研究代表者らは、mTOR 経路を阻害するとフィードバック的機構によって Mnk 経路が活性化されることを見出した。また、Bリンパ腫・Tリンパ腫発症モデルマウスにおいて、Mnk1/2 が発がん促進的に作用することを示した。一方、善岡らはストレス応答 MAP キナーゼ (JNK, p38) の足場タンパク質として同

定した JSAP1 が ERK のシグナル伝達をも制御することを明らかにし、JSAP/JLP が Mnk を介した翻訳制御に関与する可能性を示した。

## 2. 研究の目的

主要な翻訳制御シグナル系である mTOR 経路と Mnk 経路の相互作用における JSAP1/JLP の機能を明らかにすることを目的として本研究を計画した。近年、タンパク合成の亢進が認められる多くの悪性腫瘍に対して、mTOR などのタンパク合成促進分子を標的とする治療法が試みられ、ラパマイシン類縁体 (RAD-001 など) の治験が行なわれている。本研究では、がん治療において両経路の阻害剤を併用する試みの分子的基盤を提供すると共に、新たな標的分子の探索を目指す。

## 3. 研究の方法

ヒト Mnk1 に種々の点変異や欠失変異を導入して、優勢ネガティブ変異体や構成的活性化型変異体などを作製した。これらの変異体や野生型 Mnk1 をレトロウイルスベクターを用いて Mnk1/2-ダブルノックアウト (DKO) マウスの不死化胚性線維芽細胞 (MEF) に導入し、安定発現細胞株を樹立した。これらの細胞を TPA や FCS で刺激し、翻訳制御に関わる mTOR シグナル系および Mnk シグナル系について、eIF4G (Ser1108 残基) のリン酸

化やeIF4E(Ser209)のリン酸化を主な指標として解析した。各部位のリン酸化レベルは、リン酸化特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。他方、翻訳開始因子やJSAP/JLP と Mnk1 の相互作用を解析するために、HA タグやFLAG タグを接続した組換えタンパク質をHEK293T細胞で発現させ、免疫沈降法とウエスタンブロットで解析した。

#### 4. 研究成果

ヒト Mnk1 の野生型および各種変異体を安定に発現する Mnk-DKO-MEF 細胞を用いて mTOR シグナル系および Mnk シグナル系における Rapamycin や Cyclosporin の影響を調べたが、MEF では顕著な差は認められなかった。しかし、この解析の過程で、Mnk1 を強制発現させた Mnk-DKO 細胞を血清で刺激すると、リン酸化特異抗体で検出した eIF4G のリン酸化 Ser1108 レベルが急速かつ劇的に低下することを見出した。そこで、脱リン酸化阻害剤(オカダ酸や Cyclosporin) および各種の Mnk1 変異体を用いて Ser1108 の脱リン酸化について検討した結果、プロテインホスファターゼの活性化が関与しているのではなく、Ser1108 近傍の Ser1105 あるいは Ser1106 残基がリン酸化される可能性が示唆された。このことを検証するために、現在、Ser1105/1106 が Mnk1 によってリン酸化されるか否かについて検討中である。

他方、eIF4E や eIF4G と Mnk1 との相互作用について免疫沈降法について解析した結果、構成的活性化変異(Thr344Glu 変異)を有する Mnk1 が、基質である eIF4E と比較的安定な複合体を形成することを見出した。野生型 Mnk1 や他の変異体では安定複合体を形成しないことから、Thr344Glu 変異体は、いわゆる基質トラップ変異体であると考えられる。今後は、この複合体形成に JSAP/JLP が関与する可能性について検討するとともに、Thr344Glu 変異体を利用して Mnk1 の未知の標的タンパク質の同定を試みる予定である。

#### 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2件)

Joshi, S., Sharma, B., Kaur, S., Majchrzak, B., Ueda, T., Fukunaga, R., Verma, A. K., Fish, E. N., and Platanias, L. C. Essential role for Mnk kinases in Type II interferon (IFN $\gamma$ ) - signaling and its suppressive effects on normal hematopoiesis. *J. Biol.Chem.* 286, 6017-6026 (2011)

Shi, Y., Frost, P., Hoang, B., Yang, Y., Fukunaga, R., Gera, J., and Lichtenstein, A. MNK kinases facilitate c-myc IRES activity in rapamycin-treated multiple myeloma cells. *Oncogene* Feb 27. doi: 10.1038/onc.2012 (2012)

[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)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大阪薬科大学薬学部・教授 福永理己郎

(2) 研究分担者

大阪薬科大学薬学部・講師 藤井忍

(3) 本研究所担当者

シグナル伝達・教授 善岡克次