

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:2012年4月1日~2013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がん細胞の高い増殖能の維持に寄与すると考えられている。がん細胞の増殖における Mnk1 の役割を解析するために、Mnk1 に対する miR30-mimetic shRNA を作成して培養細胞に導入し、Mnk1 の発現を効率良く抑制する系を作成した。また、Mnk1/2- DKO マウスから樹立した MEF 細胞に Mnk1 を用いて解析した結果、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。

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ERKやp38MAPキナーゼによって活性化されてeIF4Eをリン酸化する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、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や、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報告した。また最近、mTOR経路によるeIF4Gのリン酸化をMnkが負に制御することも示された。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

2つの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の治験が行なわれている。本研究の成果は、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にも繋がることを期待できる。

### 3. 研究の方法

トMnk1に対する2種類のmiR30-mimetic shRNA (Mnk1-5 および Mnk1-7) を設計し、pLMP発現プラスミドに挿入した。これらをHEK293T細胞で発現させ、抗ヒトMnk1Abを用いたウェスタンブロットによりノックダウンの検討を行なった。他方、ヒトMnk1に種々の点変異や欠失変異を導入した変異体を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。

#### 4. 研究成果

がん細胞における Mnk1 の役割を解析するために、ヒト Mnk1 のノックダウンを行った。ヒト Mnk1 に対する 2 種類の miR30-mimetic shRNA (Mnk1-5 および Mnk1-7) を設計し、RNA ポリメラーゼ II によって shRNA を発現するレトロウイルスベクター-pLMP を用いて HEK293T 細胞に導入してノックダウン効率を検討した。Mnk1-5 あるいは Mnk1-7 の単独でも内生 Mnk1 の発現抑制が認められたが、両者の Co-transfection がより効果的であった。現在、Tet-on 応答プロモーターを有する pTMP ベクターを利用して 2 種類の shRNA を培養細胞に導入し、誘導的に Mnk1 のノックダウンを行う系を構築している。また、Mnk1 と Mnk2 は細胞外シグナルによる活性化動態が全く異なることから、その機能相違を明らかにする目的で、Mnk2 のノックダウン系を同様に構築している。

一方、Mnk1 を強制発現させた Mn1/Mnk2 ダブルノックアウト MEF 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 レベルが急速に低下する現象を見出した。オカダ酸や Cyclosporin などの脱リン酸化阻害剤および各種の 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ではなく、Ser1105 あるいは Ser1106 残基のリン酸化によってリン酸化 Ser1108 抗体による認識が阻害されている可能性が示唆された。そこで現在、Ser1105/1106 が Mnk1 あるいは他のプロテインキナーゼによってリン酸化される可能性について検討している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Sharma, B., Joshi, S., Sassano, A., Majchrzak, B., Kaur, S., Aggarwal, P., Nabet, B., Bulic, M., Stein, B.L., McMahon, B., Baker, D. P., Fukunaga, R., Altman, J. K., Licht, J. D., Fish, E. N., and Plataniias, L. C.: Sprouty proteins are negative regulators of interferon (IFN)-signaling and IFN-inducible biological responses. *J. Biol.Chem.* 287,

42352-42360 (2012)

2. 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* 32, 190-197 (2013)
3. Gorentla, B. K., Krishna, S., Shin, J., Inoue, M., Shinohara, M. L., Grayson, J. M., Fukunaga, R., and Zhong XP: Mnk1 and 2 are dispensable for T cell development and activation but important for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*190, 1026-1037 (2013)

[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