

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分	一般共同研究	
研究課題	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	所属・職名・氏名	大阪薬科大学・教授・福永理己郎
研究分担者	所属・職名・氏名	大阪薬科大学・講師・藤井忍
受入担当教員	職名・氏名	大阪薬科大学・講師・藤井忍
【研究目的】	<p>翻訳開始を制御する細胞内シグナル伝達系である 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、mTOR などの翻訳促進分子を標的とするラパマイシン類縁体 (Everolimus など) による治療が開始され、がんの進展における翻訳制御経路の解明が重要な課題となっている。本研究では、がん治療において mTOR 経路と Mnk 経路の両者に対する阻害剤を併用する試みの分子的基盤を解明することを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】	<p>がん細胞の増殖における Mnk1 の役割を解析するために、種々の細胞でヒト Mnk1 のノックダウンを行っている。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、HEK293T 細胞において内蔵 Mnk1 の発現を効率良く抑制することを確認した。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。</p> <p>他方、米国の Dr. Platanius との共同研究によって、髄芽腫における mTOR 経路と Mnk 経路のクロストークについて解析し、Daoy 髄芽腫細胞をラパマイシンで処理すると eIF4E の Ser209 リン酸化が亢進することを見いだした。また、この mTOR 阻害によるフィードバックリン酸化は、MAP キナーゼや Mnk1 は関与しないにも関わらず、Mnk2 によって媒介されることも見いだした。さらに、Daoy 細胞を Mnks 阻害剤 CGP57380 で処理したり、siRNA によって Mnk2 をノックダウンすることによって、細胞の mTOR 阻害剤感受性が高まり、足場非依存性増殖能の低下が認められた。以上により、髄芽腫 Daoy 細胞では mTOR 阻害によるフィードバック制御を受けて MAP キナーゼ非依存的に Mnk2 を活性化する経路が存在することが明らかとなり、mTOR 阻害剤と Mnk 阻害剤の併用による髄芽腫治療の可能性が示唆された。Mnk2 が Mnk1 とは異なる機構で活性化されることから、これらの活性化機構と生理的機能の相違を明らかにする目的で、Mnk1 と Mnk2 のキメラ分子を作成した。現在、Mnk-ダブル KO 細胞を用いて Mnk1/2 の活性化動態を解析する細胞系を構築しており、この系を用いて解析を行う。</p> <p>一方、MAP キナーゼの標的タンパク質の探索により、新たにプロテインホスファターゼ PTP9Q22 を同定した。PTP9Q22 は N 末端側にチロシンホスファターゼドメインを有し、C 末端側ドメインに複数の MAP キナーゼリン酸化部位が存在すると予想された。GST タグを結合させた PTP9Q22 を HEK293 細胞で発現させ、組換え PTP9Q22 を精製し、p-ニトロフェニルリン酸を基質に用いて酵素活性の測定を試みたが、有意な脱リン酸化活性は検出されなかった。現在、種々のホスホチロシン含有ペプチドを用いてホスファターゼ活性を検討中である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 (1) Chevillard-Briet, M., Quaranta, M., Grézy, A., Mattera, L., Courilleau, C., Philippe, M., Mercier, P., Corpet, D., Lough, J., Ueda, T., <u>Fukunaga, R.</u>, Trouche, D., Escaffit, F.: Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through Wnt signaling. <i>Hum Mol Genet.</i> 23, 2120-2131 (2014)</p> <p>(2) Cendrowski, J., Sánchez-Arévalo Lobo, V. J., Sendler, M., Salas, A., Kuhn, J.-P., Molero, X., <u>Fukunaga, R.</u>, Mayerle, J., Lerch, M. M., and Real, F. X.: Mnk1 is a novel acinar cell-specific kinase required for exocrine pancreatic secretion and response to pancreatitis in mice. <i>Gut</i> 2014 Jul 18 (2014)</p> <p>(3) Eckerdt, F., Beauchamp, E., Belli, J., Iqbal, A., Su, B., <u>Fukunaga, R.</u>, Lulla, R. R., Goldman, S., and Platanius, L. C.: Regulatory effects of a Mnk2-eIF4E feedback loop during mTORC1 targeting of human medulloblastoma cells. <i>Oncotarget</i>, August 6, 2014, PMID: 25193863 (2014)</p> <p>(4) Panja D, Kenney JW, D'Andrea L, Zalfa F, Vedeler A, Wibrand K, Fukunaga R, Bagni C, Proud CG, Bramham CR.: Two-stage translational control of dentate gyrus LTP consolidation is mediated by sustained BDNF-TrkB signaling to MNK. <i>Cell Rep.</i> 2014 Nov 20;9(4):1430-45. doi: 10.1016/j.celrep.2014</p> <p>【学会発表】 マウスロイシンリッチ <math>\alpha_2</math> グリコプロテインとシトクロム <i>c</i> の相互作用：中村舞音、松村有紗、矢野可央里、藤井忍、<u>福永理己郎</u>、池田潔、井上晴嗣、第 87 回日本生化学会大会、2P-098 (2014 年 10 月、京都)</p> <p>【その他特筆事項】 なし</p>	