



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Function of Specific region in p53-inducible Phosphatase PPM1D for Nucleolar Formation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	清田, 雄平
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第12777号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65563
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuhei_Kiyota_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 (理学)

氏名 清 田 雄 平

学 位 論 文 題 名

Study on Function of Specific Region in p53-inducible Phosphatase PPM1D for Nucleolar Formation

(核小体形成における p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D 特異的領域の機能に関する研究)

PPM1D (Protein Phosphatase Mg^{2+}/Mn^{2+} dependent 1D; Wip1, PP2C δ) は PPM1 タイプの Ser/Thr ホスファターゼである。PPM1D は様々な癌において、過剰発現や遺伝子増幅が報告されている。さらには PPM1D の C 末端欠損変異は卵巣癌および子宮頸癌の素因であることが示されており、胃癌、大腸癌および肺癌において、PPM1D 過剰発現は予後不良因子として報告されている。これらのことより、PPM1D の異常な亢進が発癌と癌の進行に深く関与することが示唆されており、PPM1D は抗癌治療における標的分子として期待されている。これまでに当研究室では、PPM1D が核小体タンパク質 Nucleophosmin (NPM, B23, numatrin) のリン酸化を制御することで核小体数を増加させることを報告している。核小体数の増加は、癌の細胞診における診断基準とされているように、多くの癌細胞に見られる特徴である。過剰発現した PPM1D は、CDC25C-CDK1-PLK1 経路の活性化を介して、NPM の Ser4 と Thr199 のリン酸化レベルの増加を引き起こすことを明らかにした。しかしながら PPM1D が制御する NPM のリン酸化の、核小体数増加につながる分子機構は依然として明らかではない。さらに、PPM1D 制御異常が発癌の原因となることが示唆されているが、PPM1D 自体の制御機構は不明である。PPM1D が属する PPM1 ファミリーのホスファターゼは、基本的な立体構造が高度に保存された触媒ドメインを有している。その一方で、PPM1D は、他の PPM1 ホスファターゼには存在しない Pro 残基がリッチな領域である P-loop を触媒ドメイン中に有する。この PPM1D の P-loop は、PPM1D 特異的な制御に関与することが予想される。以上より PPM1D は抗癌治療の標的として極めて重要であるが、PPM1D を標的とした抗癌治療の開発には至っておらず、また PPM1D の発癌および癌の進行における機構は明らかとなっていない。そのため本研究において、癌における特徴の一つである核小体数の増加を抑制する PPM1D 特異的な新規阻害剤の開発を行った。さらに、PPM1D 特異的領域が制御する核小体増加の分子機構の解明を目的として研究を実施した。

本学位論文は全 5 章より構成されている。第 1 章では総合的な研究背景を述べている。これまでの報告により明らかとされている PPM1D の機能、構造および癌における異常について概説し、核小体の形成制御および NPM の構造と機能について述べた。

第 2 章では、新規で特異的な PPM1D 阻害剤の開発を行った。これまでに当研究室では、PPM1D 阻害剤 SPI-001 を開発している。SPI-001 は、特異的かつ強力な PPM1D 阻害活性を有しているが、複雑な構造を有している。細胞膜透過性や合成の観点より、抗癌治療薬への応用のためには、阻害活性を維持したままさらなる小分子化が求められる。本研究において、より分子量の小さな新規 PPM1D 阻害剤 SL-176 の開発に成功した。SL-176 は、*in vitro* においては既存の抗癌剤と同程度の PPM1D 阻害活性を示した。速度論的解析により SL-176 は、非競合

様式で PPM1D を阻害することが明らかとなった。また、種々のホスファターゼを用いた解析によって、SL-176 の PPM1D 特異性は高いことが示された。PPM1D を過剰発現する乳癌由来の MCF7 乳癌細胞に対して、SL-176 は G2/M 細胞周期停止およびアポトーシスを誘導することが示された。さらに当研究室では、MCF7 乳癌細胞に対して、SL-176 は SPI-001 よりも高い細胞増殖抑制効果を示すことを報告している。これらより、SL-176 は PPM1D を標的とした新規抗癌治療において、有用なリード化合物として期待される。

第3章においては、PPM1D が制御する NPM のリン酸化は、NPM の多量体化を不安定化することを見出した。興味深いことに、PPM1D が過剰発現している MCF7 細胞において、核内に核小体タンパク質 NPM が集積した輝点が観察された。当研究室では、この NPM の輝点を micro 核小体と名付けた。PPM1D の Knock down および SL-176 は micro 核小体および核小体数を減少させた。一方、遺伝子導入による PPM1D の過剰発現においては、micro 核小体および核小体数の増加がみられた。これより、PPM1D による核小体数の増加と micro 核小体の形成との関与が示唆された。NPM の Ser4 および Thr199 のリン酸化ミミックおよび Ala 変異体による解析の結果、Thr199 のリン酸化は micro 核小体の形成を促進することが示唆された。これまでに NPM は 5 量体が 2 量体化することにより、10 量体化することが報告されている。そのため Ser4 および Thr199 のリン酸化ミミック変異体を用いたゲルろ過解析を実施したところ、NPM の Ser4 および Thr199 のリン酸化は NPM の 10 量体を不安定化させることが示された。

第4章においては PPM1D の特異的領域である P-loop による PPM1D の負の制御を見出した。P-loop の置換した PPM1D を細胞に導入した結果、核小体数および micro 核小体が WT と比較して増加した。ゲルろ過解析により、PPM1D は多量体を形成することが示唆された。この多量体化は、P-loop の置換により減少した。多量体化 PPM1D および単量体 PPM1D における速度論的酵素活性の解析により、PPM1D の多量体化は酵素活性負に制御することが示された。これらより、PPM1D は P-loop を介して多量体化し不活性化している可能性が示された。

第5章では本研究の統合的な結論を述べた。本研究では、PPM1D による核小体数の増加の分子機構として、NPM の多量体の不安定化によるモデルを提案した (図1)。PPM1D は CDC25C-CDK1-PLK1 経路の活性化により NPM における Ser4 および Thr199 のリン酸化を正に調節することで、NPM 10 量体の不安定化を引き起こす。10 量体形成は、NPM とヒストンの相互作用に必須であることが示唆されている。そのため不安定化した NPM はヒストンを有する核小体への結合が弱まり、その結果未成熟の核小体および micro 核小体が増え、核小体数の増加につながる事が考えられる。PPM1D の P-loop は、PPM1D の多量体化に関与し核小体形成を負に制御する。さらに、SL-176 により核小体数の増加は抑制された。以上、本モデルは PPM1D 過剰発現癌細胞における異常な核小体形成の機構を示した。核小体形成を阻害する PPM1D 阻害剤は、PPM1D 過剰発現癌細胞の増殖抑制を示す。そのため、PPM1D による核小体数増加は、新規の抗癌治療の標的経路となりうる。

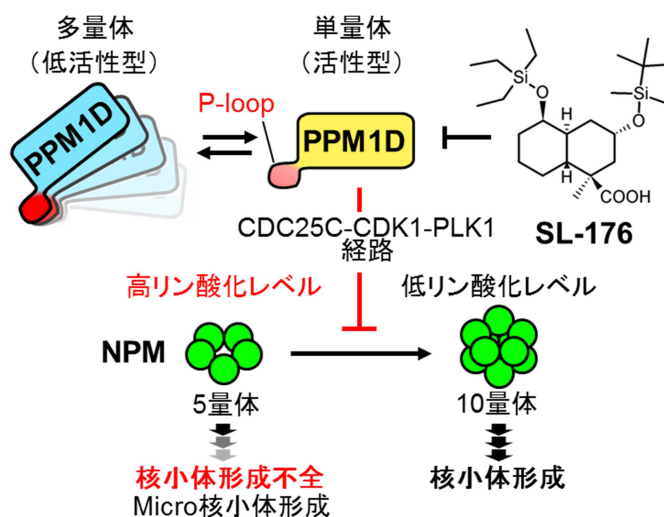


図1 PPM1D による核小体形成異常モデル

以上、本研究により、新規 PPM1D 阻害剤の開発、および PPM1D による NPM 多量体化の不安定化による核小体数増加機構モデルの提案を行った。本研究は、PPM1D の過剰発現による癌化機構の解明および癌における異常な核小体形成の機構解明につながり、PPM1D 阻害剤を用いた抗癌治療法開発へと貢献する。