



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 清 田 雄 平

審査担当者	主 査	教 授	村 上	洋 太	「理学研究院 化学部門」
	副 査	教 授	坂 口	和 靖	「理学研究院 化学部門」
	副 査	教 授	田 口	精 一	「工学研究院 応用化学部門」
	副 査	教 授	谷 野	圭 持	「理学研究院 化学部門」
	副 査	准教授	今 川	敏 明	「理学研究院 化学部門」

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)

核小体は主にリボソーム生合成の場であり、癌細胞診の重要な項目である核小体数の増加は多様な癌細胞において見られ、核小体形成における制御機構の解明が強く望まれている。PPM1 ファミリーに属する Ser/Thr ホスファターゼである PPM1D は多様な癌において過剰発現や遺伝子異常が報告されており、PPM1D 活性の異常亢進が細胞癌化および悪性化に深く関与することが示唆されている。これまでに、PPM1D による核小体タンパク質 Nucleophosmin (NPM) の過剰リン酸化の誘導が核小体数を増加させることが報告されている。しかしながら、NPM リン酸化による核小体数増加における分子機構は依然として不明な点が多い。PPM1 ファミリーにおいて、触媒ドメインの基本構造は保存されているが、各アイソフォームは特異的な領域を有している。PPM1D は触媒ドメイン中にプロリンリッチな特異的領域である P-loop を有しており、P-loop が PPM1D 特異的な制御に関与することが予想されている。以上のように、PPM1D は抗癌治療の標的として極めて重要であるが、PPM1D を標的とした新規治療法の開発には至っておらず、また PPM1D による細胞癌化および悪性化における制御機構は明らかとなっていない。

本学位論文は全五章より構成されている。第一章では総括的な序論として核小体および PPM1D を含む本研究における背景および目的を述べている。

第二章では、新規 PPM1D 阻害剤 SL-176 の開発について述べている。PPM1D 過剰発現癌細胞において、PPM1D 阻害は、細胞増殖抑制を引き起こすことが報告されており、PPM1D 阻害剤は抗癌剤の候補として期待されている。本研究において開発した SL-176 は *in vitro* において強力な PPM1D 阻害活性を有しており、また PPM1D 特異性は高いことが示された。PPM1D 過剰発現 MCF7 乳癌細胞に対して、SL-176 は核小体数を減少させ、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。また、SL-176 は、既存の PPM1D 阻害剤において最も高い細胞増殖抑制効果を示すため、PPM1D を標的とした新規抗癌治療法開発におけるリード化合物として期待される。

第三章では、PPM1D による NPM の 10 量体構造の不安定化について述べている。PPM1D が過剰発現 MCF7 細胞において、核内に NPM が集積した輝点が見出され、micro 核小体と名付けた。PPM1D 発現安定細胞株および SL-176 による解析により、PPM1D 酵素活性と micro 核小体形成の正の相関を明らかとしている。PPM1D が制御する NPM のリン酸化サイトである 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、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を示している。

第四章では、PPM1D の特異的領域である P-loop による PPM1D の負の制御機構を見出している。P-loop の置換した PPM1D を細胞に導入した結果、micro 核小体および核小体数が正常型 PPM1D と比較して増加することを明らかにした。ゲルろ過解析により PPM1D は P-loop を介して多量体を形成することを示唆し、速度論的酵素活性の解析により、PPM1D の多量体化が酵素活性を負に制御することを示している。

第五章では、本研究を総括し、新規な PPM1D による核小体形成異常の機構モデルを提案している。本モデルは、P-loop による多量体化を介した PPM1D 活性調節により、NPM リン酸化レベルが制御され、NPM 10 量体形成を引き起こす経路を示すものである。PPM1D の機能亢進により、NPM 構造の不安定化が正常な核小体形成を阻害し、micro 核小体および核小体数の増加につながることを考えられる。また、本研究において開発された PPM1D 特異的阻害剤 SL-176 が、核小体数の増加を抑制しており、PPM1D が新規の抗癌治療の標的経路となることを示唆している。

以上、本研究は、核小体形成のリン酸化状態による制御機構および PPM1D における多量体を介した機能調節機構を初めて明らかとしたものである。さらに、PPM1D を介した新規な核小体形成モデルは、PPM1D の過剰発現による細胞癌化およびその悪性化に対して、新たな知見を与えるものである。さらに、本論文の成果は、PPM1D 阻害剤を用いた抗癌治療法開発へと大きく展開されることが期待される。本研究の一部は、原著論文として国際誌 1 報に報告されている。よって審査員一同は、著者が北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。