HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Function of Specific region in p53-inducible Phosphatase PPM1D for Nucleolar Formation [an abstract of entire text]
Author(s)	清田, 雄平
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/75439
Type	doctoral thesis
File Information	Yuhei_Kiyota_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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）

Graduate School of Chemical Sciences and Engineering,
Hokkaido University

Yuhei Kiyota

2017

第 1 章　General Introduction

PPM1D（Protein Phosphatase Mg^{2+}/Mn^{2+} dependent 1D; Wip1, PP2Cδ）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いる。このように PPM1D は抗癌治療における標的分子として期待されているが、PPM1D を標的とした抗癌治療の開発には至っていない。さらに、PPM1D の発現量増加を含む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 自体の活性制御機構は不明であり、発癌および癌の進行における、PPM1D が関与する機構はほとんど明らかとなっていない。癌細胞の特徴として、核小体数の増加が知られており、癌の細胞診においても核小体数は重要な診断基準となっている。これまでに当研究室では、核小体形成に関与する Nucleophosmin（NPM, B23, numatrin）を介して PPM1D が核小体の形成に関与することを報告している。本研究においては、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。

第 2 章　Development of an inhibitor specific for PPM1D phosphatase

背景・目的

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 阻害剤の開発を目的として研究を行った。

方法

新規 PPM1D 阻害剤開発のため、リコンビナント酵素を用いた *in vitro* phosphatase assay により化合物の PPM1D 阻害活性を解析した。リコンビナント PPM1D は 1-420 残基の触媒ドメインを、His tag 融合タンパク質として大腸菌により発現・精製を行った。基質としては、PPM1D の脱リン酸化標的タンパク質である p53 の Ser15 を有するリン酸化ペプチドを化学合成し用いた。また、PPM1D が過剰発現している癌細胞である MCF7 細胞に対し、PPM1D 阻害剤を投与し細胞増殖抑制効果を解析した。

結果および考察

in vitro phosphatase assay により新規な PPM1D 阻害剤 SL-176 を見出した。SL-176 は、*in vitro* においては既存の PPM1D 阻害剤と同程度の 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　Increase the micro-nucleolus formation by PPM1D correlated with the nucleolar number

背景・目的

これまでに当研究室では、PPM1D が核小体タンパク質 NPM 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としている。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。本研究において PPM1D が制御する NPM のリン酸化による、NPM 制御の分子機構の解明を目的とした。

方法

PPM1D を過剰発現している MCF7 細胞において、NPM を免疫染色し画像解析を実施することで、核小体の形成過程を解析した。また、肺癌由来の H1299 細胞に PPM1D を過剰発現させ同様の解析を行った。さらに PPM1D が脱リン酸化する NPM リン酸化サイトの NPM の多量体形成への影響を解析するために、NPM の Ser4 および Thr199 のリン酸化ミミック変異体を His タグ融合リコンビナントタンパク質として大腸菌系により発現および精製を行った。精製したリコンビナント NPM はゲルろ過解析によって、多量体の形成を解析した。

結果および考察

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。本研究では、この NPM の輝点を micro 核小体と名付け、さらなる解析を実施した。PPM1D の Knock down および PPM1D 阻害剤 SL-176 の投与は、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多量体形成能の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　Regulation of PPM1D by its specific region P-loop

背景・目的

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。Pro 残基がリッチな領域はタンパク質-タンパク質相互作用において重要な役割を果たすことが報告されている。したがって PPM1D の P-loop は、PPM1D 特異的な制御に関与することが予想され、PPM1D の制御への影響を明らかとすることを目的として研究を実施した。

手法

PPM1D 特異的である P-loop を、同じファミリーに属する PPM1A の相当配列に置換した P-loop 置換体を用いて解析を実施した。まず、H1299 細胞に P-loop 置換体を導入し、WT と比較し核小体形成に対する PPM1D 変異体の影響を解析した。さらに、P-loop 置換体をリコンビナント酵素として大腸菌系を用い発現および精製を行い、PPM1D の活性および多量体形成を解析した。

結果および考察

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。ま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　Conclusions

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。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ことが考えられる。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。以上、本研究における新規 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。