



Title	がん原遺伝子産物PPM1Dのプロテアソーム依存的分解機構に関する研究
Author(s)	高橋, 正樹
Description	配架番号 : 2994
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16901号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16901
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99746
Type	doctoral thesis
File Information	TAKAHASHI_Masaki.pdf, 全文



学 位 論 文

がん原遺伝子産物 PPM1D のプロテアソーム依存的分解機構に関する研究

(Studies on the proteasomal degradation mechanism of the oncoprotein PPM1D)

2026 年 3 月

北海道大学

高橋 正樹

学 位 論 文

がん原遺伝子産物 PPM1D のプロテアソーム依存的分解機構に関する研究

(Studies on the proteasomal degradation mechanism of the oncoprotein PPM1D)

2026 年 3 月

北海道大学

高橋正樹

目次

発表論文および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
実験方法	12 頁
実験結果	37 頁
考察	64 頁
結論	69 頁
謝辞	71 頁
利益相反	72 頁
引用文献	73 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Masaki Takahashi, Takeshi Kondo, Shogo Kimura, Akira Nakazono, Shusei Yoshida, Takeshi Wada, Masashi Watanabe, Shigetsugu Hatakeyama.
PPM1D is directly degraded by proteasomes in a ubiquitination-independent manner through its carboxyl-terminal region.
Journal of Biomedical Science. 32:88, 2025.

要旨

【背景と目的】

PPM1D (protein phosphatase Mg^{2+}/Mn^{2+} dependent 1D) は、セリン/スレオニン特異的ホスファターゼであり、p53 経路を介した DNA 損傷応答の負のフィードバック制御を担う重要な分子である。DNA 損傷を受けた細胞では p53 が活性化し、細胞周期停止や DNA 修復が誘導されるが、修復完了後には PPM1D が誘導され、p53 シグナルを抑制することで細胞の恒常性維持を助ける。しかし、PPM1D の過剰発現や C 末端欠損変異は、p53 依存的アポトーシスおよびチェックポイント制御を抑制し、腫瘍形成や治療耐性の獲得に寄与することが報告されている。近年、PPM1D は乳がん、肺がん、神経膠腫、造血器悪性腫瘍など多様ながんで遺伝子増幅や過剰発現がみられ、COSMIC Tier 1 に分類される代表的ながん遺伝子として注目されている。また、これらの知見を背景に、PPM1D 阻害剤を新規抗腫瘍薬として応用する研究も進展している。

PPM1D の分解機構に関しては、これまで HIPK2 による N 末端領域のリン酸化がプロテアソーム依存的な分解を促進すること、さらに C 末端領域が分解における重要な標的であることが報告されているものの、その分子機構の全貌は依然として不明である。特に、プロテアソームが PPM1D のどの領域を直接認識するのか、またユビキチン化依存性がどの程度関与しているのかは明らかでない。

一方、近年注目されているユビキチン化非依存的プロテアソーム依存的分解 (ubiquitin-independent proteasomal degradation, UbInPD) は、従来のユビキチン化を介する分解経路とは異なる新たな制御様式であり、細胞内タンパク質の約 20% がこの経路により分解されると推定されている。しかし、PPM1D の分解に UbInPD が関与するか否かについてはこれまで検証されていない。

本研究の目的は、PPM1D の分解機構を分子レベルで詳細に解明し、ユビキチン依存的および非依存的経路、重要な認識領域、関与する補助因子を明確化することである。さらに、PPM1D 阻害剤とプロテアソーム阻害剤の併用による抗腫瘍効果を検証し、悪性腫瘍に対する新たな治療戦略の基盤を構築することを目的とした。

【方法と結果】

PPM1D の安定性および分解経路を解析するため、複数のヒト腫瘍細胞株を各種薬剤で処理し、ウェスタンブロット解析で PPM1D 発現量の変化を評価した。実験には、野生型 PPM1D 発現細胞 (HEK293T、HeLa)、野生型と C 末端欠損変

異型 PPM1D をヘテロ発現する細胞 (HCT116、U2OS)、および PPM1D の N 末端領域 (FLAG-PPM1D-N) または C 末端領域 (FLAG-PPM1D-C) を過剰発現させた HEK293T 細胞を用いた。

Cycloheximide chase assay では、野生型 PPM1D が速やかに分解される一方、C 末端欠損変異体は細胞内で安定していた。プロテアソーム阻害剤処理により両者の発現が増加したことから、PPM1D がプロテアソームにより分解されることが示された。

次に、プロテアソーム分解機構におけるユビキチン化依存性を検討するために、ユビキチン化活性化酵素 E1 阻害剤 TAK-243 による処理を行った。その結果、野生型 PPM1D の発現量に変化はみられず、C 末端欠損変異 PPM1D は部分的に増加し、FLAG-PPM1D-C は減少した。さらに TAK-243 に加えて、プロテアソーム阻害剤である MG132 との併用処理も行ったところ、野生型 PPM1D は MG132 単独処理と同等に蓄積した。これは、PPM1D の分解が主として UbInPD 経路で進行している、あるいはユビキチン化阻害によりこの経路が代償的に活性化されることが示唆された。また、TAK-243、MG132 の併用処理によって、FLAG-PPM1D-N は MG132 単独処理と同等に蓄積し、FLAG-PPM1D-C は MG132 単独処理と同等に回復した。これらの結果から、FLAG-PPM1D-N がユビキチン化依存的分解されることが示唆された。また、TAK-243、MG132 の併用処理によって、FLAG-PPM1D-C は MG132 単独処理と同等に回復した。これらの結果から、FLAG-PPM1D-N がユビキチン化依存的分解されることが示唆された。また、TAK-243、MG132 の併用処理によって、FLAG-PPM1D-C は MG132 単独処理と同等に回復した。これらの結果から、FLAG-PPM1D-N がユビキチン化依存的分解されることが示唆された。

PPM1D の C 末端領域を段階的に欠失させた解析から、アミノ酸残基 450–501 が UbInPD を抑制するために不可欠であることが明らかとなった。また、C 末端 35 残基を欠損した変異体ではいずれの阻害剤にも反応せず、この領域が UbInPD に必須であることを示した。さらに、20S プロテアソームを阻害する NQO1 阻害剤 (ジクマロール) 処理により PPM1D 発現量が減少し、20S プロテアソームが PPM1D を直接認識・分解することが示唆された。リコンビナント PPM1D を用いた *in vitro* 実験でも、20S プロテアソームによる PPM1D の直接分解を確認した。

質量分析により PPM1D C 末端領域に結合する分子を探索した結果、19S 制御パーティクル構成因子 PSMD14 およびプロテアソーム活性化因子 PSME3 が結合分子候補として同定された。HEK293T 細胞におけるロックダウン実験により、これらの分子を抑制すると PPM1D が安定化することが判明し、両者が PPM1D 分解促進に寄与することが示唆された。

さらに、プロテアソーム阻害剤 (ボルテゾミブ) と PPM1D 阻害剤を併用した処理では、野生型 p53 を有する腫瘍細胞において抗腫瘍効果が顕著に増強した。加えて、ボルテゾミブ耐性細胞を用いた実験でも同様の相乗的効果が認められ、PPM1D 阻害が耐性克服の一助となる可能性が示された。

【考察】

本研究により、PPM1D の C 末端に存在する非構造化領域がデグロンとして機能し、20S プロテアソームがこれを直接認識してユビキチン非依存的に分解することが明らかとなった。また、アミノ酸残基 450–501 領域がユビキチン化を介して UbInPD を抑制する上で不可欠であり、PSMD14 および PSME3 がこの過程を活性化する補助因子である可能性が示唆された。さらに、C 末端欠損変異 PPM1D を発現する腫瘍細胞では UbInPD による分解を回避し、PPM1D が異常に安定化していた。これに対し、人工的に作製した FLAG-PPM1D (1–395) はより速やかに分解され、アミノ酸 396–449 領域がユビキチンリガーゼによる認識を妨げる構造的役割を担う可能性が示された。

ユビキチン化による UbInPD 抑制機構としては、他のユビキチン化タンパク質を介した間接的な抑制、あるいは Lys469 および Lys480 の直接的ユビキチン化による C 末端構造の安定化が想定される。これらの知見は、PPM1D が平常時には UbInPD によって低レベルに維持され、DNA 損傷時の p53 経路活性化を迅速に許容する一方で、ユビキチン依存的経路が応答終結過程における精密な制御を担うことを示している。したがって、PPM1D の二重の分解機構は、DNA 損傷の強度や修復可能性に応じて p53 活性を精密に制御し、細胞運命を最適化する上で重要な役割を果たしていると考えられる。

【結論】

本研究は、PPM1D 分解機構の分子基盤を明らかにし、C 末端領域と UbInPD 経路の関与を実証した。これらの発見は、PPM1D を標的とする新規治療戦略の理論的基盤を提供するものであり、さらに PPM1D 阻害剤とプロテアソーム阻害剤の併用が相乗的抗腫瘍効果を発揮することを示した。本成果は、がん治療における分解経路制御の新たな可能性を提示するものである。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AEBSF	4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
CBB	coomassie brilliant blue
CHX	cycloheximide
CI	combination index
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Fa	fraction affected
FBS	fetal bovine serum
IDR	intrinsically disordered regions
MEM	Eagle's minimum essential medium
NEM	N-ethylmaleimide
NQO1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1
PPM1D	protein phosphatase Mg^{2+}/Mn^{2+} dependent 1D
PROTAC	PROteolysis TArgeting Chimera
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
SD	standard deviation
TB	transformation buffer
UbInPD	ubiquitin-independent proteasomal degradation

緒言

1. PPM1D の生理的役割

PPM1D (protein phosphatase Mg^{2+}/Mn^{2+} dependent 1D、別名 : WIP1) は、セリン/スレオニン特異的なタンパク質ホスファターゼであり、 Mg^{2+} または Mn^{2+} イオンを補因子とする PPM ファミリーに属する酵素的特徴を持つ(Fiscella *et al.*, 1997)。

PPM1D は、細胞が DNA 損傷や放射線・紫外線によるストレスを受けたとき、p53 の転写活性を介して誘導され、p53 活性化後の応答を抑制する負のフィードバック機構を形成する (図 1)。DNA 損傷を受けた細胞内ではまず p53 が活性化され、細胞周期停止や DNA 修復機構の誘導が起こる。修復が完了すれば、PPM1D の発現が上昇し、p53 やその関連シグナルを抑制することで、細胞が修復後に正常増殖へと戻るための調整機構として機能する。このような動きにより、細胞はストレスを受けた後も過剰反応や長期停止を回避しつつ、恒常性を維持することが可能となる(Deng *et al.*, 2020)。

このように、PPM1D は p53 シグナルを介したストレス応答の切り替えを担う重要な分子であり、細胞周期制御、DNA 修復、アポトーシス抑制など多様な過程に関与している。適切な PPM1D の制御は、細胞恒常性の維持とストレス適応に不可欠であり、その異常はがん化にも深く関わるということが後に明らかになっている。

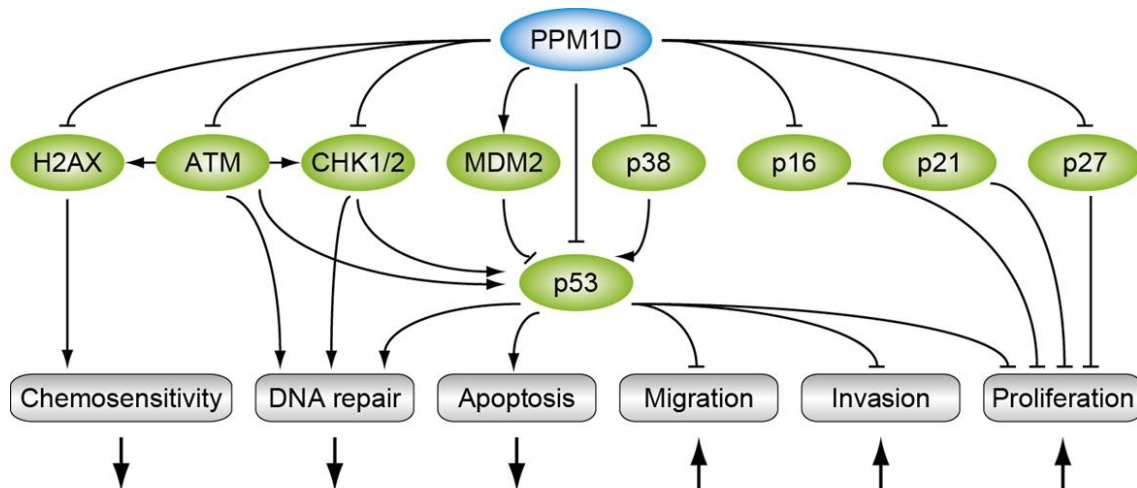


図 1. PPM1D と p53 のシグナル伝達経路の概略図

2. PPM1D のがん関連性と変異の特徴

近年のがんゲノム解析により、PPM1D は重要ながん遺伝子として注目されている。COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) においても Tier 1 に分類されるほど、臨床的な関心が高い遺伝子である(Sondka *et al.*, 2018)。多くの研究が、乳がん・肺がん・造血系悪性腫瘍などにおいて PPM1D の遺伝子増幅や過剰発現を報告しており、これらは腫瘍の増殖促進、転移、治療抵抗性と関連しているが分かっている(Deng *et al.*, 2020)。また、PPM1D を高発現させた細胞では、p53 依存的アポトーシスの抑制や細胞周期の再開が促されることが示されており、過剰な PPM1D は p53 経路を抑制するため、DNA 損傷に対する細胞のチェックポイントが低下し、腫瘍形成や治療耐性に寄与すると考えられる(Deng *et al.*, 2020)。

さらに、臨床検体や細胞株では、PPM1D に C 末端を欠失する変異を生じることが知られている。これらの C 末端欠失変異体は、通常存在する分解シグナルを失うため、タンパク質の安定性が増加し、機能が亢進することが報告されている。結果として、p53 の抑制が持続的に起こり、腫瘍形成に有利に働くことが示唆されている(Kleiblova *et al.*, 2013; Burocziova *et al.*, 2023; Khadka *et al.*, 2022)。

3. PPM1D 分解機構

タンパク質の発現量は転写・翻訳だけでなく分解制御によっても厳密に調節される。PPM1D の分解機構については、これまでいくつかの研究から部分的に明らかになっている (図 2)。

例えば、HIPK2 が PPM1D の N 末端領域における特定のセリン残基 (Ser54、Ser85) をリン酸化することで、PPM1D のユビキチン依存的プロテアソーム分解を促進することが報告されている(Choi *et al.*, 2013)。HIPK2 は DNA 損傷応答において p53 をリン酸化しその活性化に寄与することが知られており、この経路における PPM1D 分解促進作用は、p53 の負の制御を解除して損傷応答を適切に進行させるための重要な調節段階と考えられる。しかし、HIPK2 が誘導する PPM1D 分解に関与するユビキチンリガーゼについては、現時点では同定されていない。

一方で、PPM1D の C 末端領域が分解における重要な標的であることを示す研究も存在する。HCT116 細胞 (p.L450X 変異) および U2OS 細胞 (p.R458X 変異) を用いた解析では、野生型 PPM1D と C 末端欠損変異 PPM1D の両方をヘテロ発現する場合、変異型 PPM1D タンパク質が野生型の 10~20 倍高いレベルで発現

していることが報告されている(Kleiblova *et al.*, 2013)。この差は転写量の違いではなく、タンパク質安定性の上昇によるものであることが示唆されている。さらに、プロテアソーム阻害剤を処理すると野生型 PPM1D の蓄積が観察されることから、PPM1D の C 末端領域がプロテアソームによる分解の直接的な標的となっている可能性が高いと考えられている。

しかしながら、PPM1D 分解機構の詳細、特にプロテアソームが PPM1D をどのように認識し、どの分子経路を介して分解するのかについては未解明な部分が多い。PPM1D 分解機構の破綻ががんの進行を強力に促進することを考慮すると、今後この経路を分子レベルで解明することは、PPM1D を標的とした新たな治療法の開発にも直結すると考えられる。

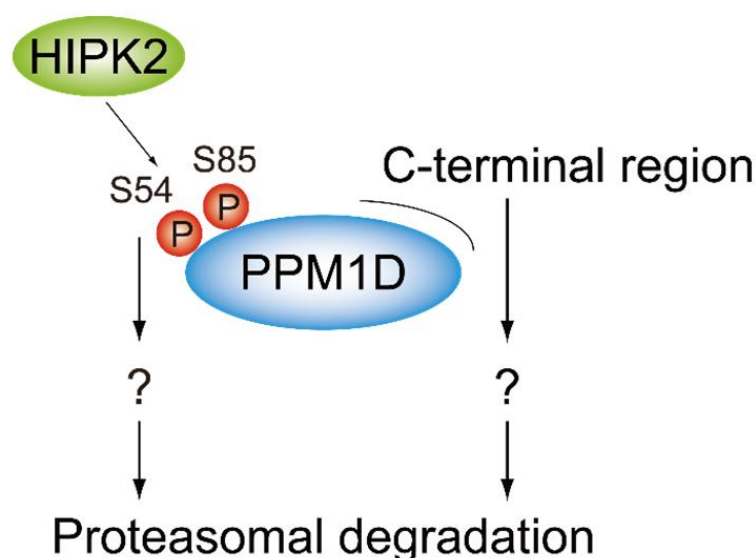


図 2. 現在知られている PPM1D の分解機構

4. ユビキチン非依存的プロテアソーム分解 (UbInPD) の概念

多くのタンパク質がユビキチン依存的プロテアソーム経路によって分解される。この経路では、標的タンパク質がユビキチンリガーゼによりポリユビキチン化され、その標識により 26S プロテアソームが認識し分解する。しかし近年、一部のタンパク質がユビキチン化非依存的プロテアソーム依存的分解 (ubiquitin-independent proteasomal degradation, UbInPD) の対象となることが明らかとなってきた。この経路では、ユビキチン修飾を介さずにプロテアソームが直接標的タンパク質を認識し分解する(Murai *et al.*, 2018; Murakami *et al.*, 1992; Asher *et al.*, 2005;

Chen *et al.*, 2004)。

代表的な UbInPD 基質としては、ODC1、p53、p73、c-Myc、p21 などが報告されており、これらは細胞周期制御やアポトーシス、増殖シグナルの調節に重要な役割を果たすタンパク質である(Murai *et al.*, 2018; Murakami *et al.*, 1992; Asher *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2004)。さらに近年の研究では、これまで知られていなかった多数の分子が UbInPD の対象となり得ることが示され、UbInPD の対象となるタンパク質の種類は従来考えられていたよりも広範であることが分かってきた(Makaros *et al.*, 2023)。推定では、細胞内タンパク質の約 20%が UbInPD 経路により分解されている可能性があるとされている(Baugh *et al.*, 2009)。

UbInPD が標的タンパク質を認識する分子メカニズムについては、近年多くの研究が進められている。これまでの報告では、標的タンパク質の C 末端配列や構造的に不安定な非構造化領域 (intrinsically disordered regions, IDR)、および疎水性残基を含む特定のアミノ酸配列モチーフが、プロテアソームによる認識と分解効率を高めることが示されている(Makaros *et al.*, 2023; Jariel-Encontre *et al.*, 2008; Kisselev *et al.*, 2002)。これらの特徴は、ユビキチン修飾を経ずにプロテアソームに直接結合する基質の特性として重要視されている。

5. プロテアソーム阻害剤とがん治療

プロテアソームは、細胞内で不要になったタンパク質や異常タンパク質を分解する主要な酵素複合体であり、細胞のタンパク質恒常性の維持に不可欠である。腫瘍細胞は増殖速度が速く、DNA 損傷やストレス応答による異常タンパク質が蓄積しやすいため、プロテアソーム依存的な分解機構に強く依存している。この特性を標的とした治療戦略として、プロテアソーム阻害剤が開発されてきた。

代表的なプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブは、26S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットに存在するキモトリプシン様活性部位を可逆的に阻害することにより、標的タンパク質の分解を抑制する。この阻害作用により、細胞内に未分解のタンパク質が蓄積し、小胞体ストレスや酸化ストレスの増大、さらには細胞周期停止やアポトーシスの誘導が起こることが知られている(Mujtaba and Dou, 2011)。特に、多発性骨髄腫やマントル細胞リンパ腫においては、ボルテゾミブは標準治療の一部として臨床的に高い有効性を示しており、患者の生存期間延長に寄与している。また、乳がんや肺がんなどの固形腫瘍に対しても、ボルテゾミブの有効性や併用療法の可能性が臨床試験や基礎研究で検討されている(Liu *et al.*, 2021)。

しかしながら、ボルテゾミブには長期投与や高用量投与により、腫瘍細胞が薬剤耐性を獲得する臨床課題があり、ボルテゾミブ単独では十分な治療効果が得られない問題点が指摘されている。したがって、プロテアソーム阻害療法の効果を最大化するためには、耐性に対する新たな戦略の開発が不可欠である。例えば、耐性を回避するために別の標的分子や、シグナル経路を同時に阻害する併用療法、あるいは耐性細胞に特異的に作用する新規阻害剤の開発などがこれまでに進められている(Lü and Wang, 2013)。

6. PPM1D 阻害剤の開発と治療的意義

PPM1D が腫瘍の増殖や治療抵抗性に寄与することから、PPM1D の阻害剤は抗腫瘍薬として注目を集めている。近年、PPM1D を選択的に阻害する小分子化合物がいくつか開発されており、GSK2830371、SPI-001、CCT007093 などが代表例である(Gilmartin *et al.*, 2014; Yagi *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014)。これらの阻害剤は、PPM1D のホスファターゼ活性を抑制することにより、腫瘍細胞内で p53 経路を再活性化し、細胞周期停止やアポトーシス誘導を促進することが報告されている。特に、PPM1D 阻害剤は C 末端欠失変異を有する腫瘍細胞でも効果を示すことが示されており、従来の治療抵抗性を示す腫瘍に対する新規治療戦略として期待されている。

一方で、PPM1D 阻害剤の臨床応用にはいくつかの課題が存在する。まず、阻害剤の選択性や安定性、細胞膜透過性などの薬物学的性質を改善する必要がある。現在の阻害剤は、*in vitro* での活性は高いものの、生体内でのバイオアベイラビリティが限定される場合がある。また、腫瘍以外の正常細胞における p53 活性の過剰な誘導は、予期せぬ細胞死や毒性を引き起こす可能性があり、安全性評価が重要である。さらに、腫瘍細胞内での耐性獲得や代謝変化により、治療効果が減弱する可能性もある。これらの課題を克服するために、阻害剤の構造改良、投与スケジュールの最適化、標的腫瘍選択性の向上などが求められている。

以上のように、PPM1D 阻害剤は腫瘍細胞における p53 経路の再活性化を通じて抗腫瘍効果を示す有望な分子標的治療薬であり、特に耐性腫瘍や C 末端欠失変異を有する腫瘍に対する治療戦略として注目されている。一方で、選択性・安定性・安全性の向上や併用療法の検討など、臨床応用に向けた課題も残されており、今後の研究の進展が期待される。

7. 本研究の目的

本研究では、PPM1D の分解機構を詳細に解析し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。これまで、PPM1D の C 末端領域がプロテアソームによる分解において重要な役割を果たすことが示唆されていたものの、具体的な分解経路や関与する補因子は不明であった。そこで本研究では、まず PPM1D のプロテアソームにおける分解が、ユビキチン化依存的もしくは非依存的であるのか、そして、どの領域が分解において重要であるのか、詳細に解明を行い、加えて関与する補因子の同定を目指した。

さらに、PPM1D 阻害剤とプロテアソーム阻害剤の併用が腫瘍細胞における抗増殖効果をどの程度向上させるかを検証し、相乗的な抗腫瘍戦略としての可能性を評価した。これにより、単独薬剤では克服が困難な耐性腫瘍や PPM1D 変異体を有する腫瘍細胞に対する新たな治療アプローチの基盤を提供することを目指した。

実験方法

1. 実施体制

本研究は、北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定（承認番号 2020-020）に従って実施した。

2. 実験材料

本研究で使用した実験材料の種類、由来、および調製方法を以下に示す。なお、使用した装置や試薬などの製造業者名は、社名の後に「社」または「(株)」の略記を付して記載した。

<1> 大腸菌株、培養細胞

大腸菌 XL-10 Gold 株（Stratagene 社）

HEK293T 細胞（RIKEN BRC）

HEK293 細胞（ATCC）

HeLa 細胞（ATCC）

HCT116 細胞（ATCC）

U2OS 細胞（ATCC）

A549 細胞（ATCC）

U87MG 細胞（ATCC）

hTERT-RPE1 細胞（ATCC）

<2> 装置

PCR 装置：

MJ Mini（バイオラッドラボラトリーズ（株））

StepOne™リアルタイム PCR システム（Applied Biosystems 社）

DNA シークエンサー：ABI SeqStudio（Thermo Fisher Scientific 社）

電気泳動槽：

スラブ電気泳動装置（日本エイドー（株））

Mupid-2plus（Advance（株））

トランスブロットセル（バイオラッドラボラトリーズ（株））

パワーサプライ：BP-T5（Bio craft（株））

UV トランスイルミネーター（アガロースゲル撮影装置）：

AS-100BT（Bio craft（株））

超音波破碎機：Sonifier250（Branson 社）

濾紙：3MM (Whatman 社)

大腸菌培養用シェーカー：Innova4330 (New Brunswick Scientific 社)

インキュベーター：TVN680DA incubator (Advantec 社)

CO₂ インキュベーター：

Forma series II water jacketed CO₂ incubator (Thermo electron 社)

ヒートブロック：Thermo Alumi bath ALB-221 (IWAKI 社)

吸光光度計：Smart Spec 3000 ((バイオラッドラボラトリーズ (株))

遠心機：

Centrifuge 5415R (Eppendorf 社)

MX-300 (TOMY 社)

Avanti J-E centrifuge (Beckman Coulter 社)

pH メーター：Seven Easy (Mettler Toledo 社)

オートクレーブ装置：KS-323 (TOMY 社)

ドライオーブン：SS-K-300 (いすゞ製作所 (株))

濾過滅菌用フィルター：MILLEXHV (Millipore 社)

質量分析装置およびソフトウェア：

Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific 社)

ナノフローウルトラ HPLC (EASY-nLC 1000 ; Thermo Fisher Scientific 社)

C18 Reprosil 分析カラム (日京テクノス社)

Xcalibur ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific 社)

Proteome Discoverer ソフトウェア (バージョン 2.4 ; Thermo Fisher Scientific 社)

圧力式細胞破碎機：French pressure cell press (Aminco 社)

マイクロプレートリーダー：SpectraMax Paradigm (Molecular Devices 社)

<3> キット

タンパク質定量キット：(バイオラッドラボラトリーズ (株))

DNA シークエンスキット：BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems 社)

DNA 連結キット：TaKaRa DNA ligation kit (タカラバイオ (株))

プラスミド抽出キット：

NucleoBond® Xtra Midi EF (タカラバイオ社)

Fastgene plasmid mini prep kit (日本ジェネティクス社)

リアルタイム PCR マスターミックス：

Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社)

細胞増殖／細胞毒性アッセイキット：

Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所 (株))

<4> 各種酵素

DNA 合成酵素：

KOD FX (TOYOBO (株))

DNA polymerase I Klenow fragment (タカラバイオ (株))

RNA 分解酵素：RNase A (Novagen 社)

トリプシン (Sigma 社)

制限酵素類：

BamHI (タカラバイオ (株))

NotI (タカラバイオ (株))

XhoI (タカラバイオ (株))

<5> 各種核酸

pQCXIP (タカラバイオ (株))

pGEX6P (Cytiva 社)

pCL10A1 (Novus Biologicals 社)

Human Matchmaker cDNA Library Mix (Clontech 社、複数のヒト cDNA library を混合した。)

Silencer select siRNA (Thermo Fisher Scientific 社)

siPSME3#1 (s19871)

siPSME3#2 (s19872)

siPSMD14#1 (s19921)

siPSMD14#2 (s19919)

<6> メンブレン、フィルター

PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) 膜：

Immobilon-P Transfer membrane (MILLIPORE 社)

MILLEX-HV (0.45 μ m フィルター) (MILLIPORE 社)

<7> 培養用試薬

大腸菌培養試薬：

Bacto Trypton (Sigma 社)

Yeast Extract (Sigma 社)

Bacto Agar (Sigma 社)

細胞培養試薬：

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich 社)

McCoy's 5A medium (Thermo Fisher Scientific 社)
Eagle's minimum essential medium (MEM) (Nacalai tesque 社)
Eagle medium/nutrient mixture F-12 (DMEM/Ham's F-12) (Thermo Fisher Scientific 社)
Fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific 社)

<8> ビーズ類

Glutathione Sepharose Beads 4B (Cytiva 社)
FLAG M2 agarose (Sigma 社)

<9> 抗生物質類

Ampicillin (Sigma 社)
Puromycin (Sigma 社)
Cycloheximide (Sigma 社)

<10> タンパク質分解酵素阻害剤、プロテアソーム阻害剤、PPM1D 阻害剤

4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) (Roche 社)
N-ethylmaleimide (NEM) (Sigma 社)
MG132 (Calbiochem 社)
Carfilzomib (Cayman Chemical 社)
Bafilomycin A1 (Cayman Chemical 社)
Chloroquine (Sigma 社)
Bortezomib (StressMarq Biosciences 社)
GSK2830371 (セレックバイオテック (株))

<11> 抗体

マウス抗 FLAG タグモノクローナル抗体 (M2) (Sigma 社)
ウサギ抗 PPM1D 抗体 (Cell Signaling Technology 社)
ウサギ抗 PSME3 抗体 (Proteintech 社)
ウサギ抗 PSMD14 抗体 (Proteintech 社)
ウサギ抗 c-Myc 抗体 (Cell Signaling Technology 社)
ウサギ抗 NCOA4 抗体 (Bethyl Laboratories 社)
マウス抗 GAPDH モノクローナル抗体 (6C5) (Ambion 社)
マウス抗 Vinculin モノクローナル抗体 (Sigma 社)
ウサギ抗 NCOA3/SRC3 抗体 (Cell Signaling Technology 社)
ウサギ抗 CDKN1A/p21 抗体 (Cell Signaling Technology 社)

マウス抗 TP53 抗体 (Cell Signaling Technology 社)
ウサギ抗 NQO1 抗体 (Proteintech 社)
ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 二次抗体 (プロメガ社)
ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体 (プロメガ社)

<12> 遺伝子導入試薬：

FuGENE® HD (Roche 社)
Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific 社)

<13> SDS-PAGE、ウエスタンブロット関連試薬

Mini-PROTEAN TGX Gels (Biorad 社)
SDS-PAGE 用タンパク質分子量マーカー：
プレステインドエクセルラダー Broad range (アンテグラル社)
ECL Western Blotting Detection Reagents (GE healthcare 社)
X 線フィルム： CL-XPosure Film (Thermo Scientific 社)
CBB R-250 (Nacalai tesque 社)

<14> その他試薬

エタノール (Sigma 社)
イソプロパノール (Sigma 社)
フェノール (Sigma 社)
8-quinolinol (Sigma 社)
クロロホルム (Sigma 社)
3-メチル-1-ブタノール (Sigma 社)
1 kb plus DNA ラダーマーカー (Invitrogen 社)
アガロース (Sigma 社)
低融点アガロース (Sigma 社)
Trizma base (Sigma 社)
HEPES (Sigma 社)
HCl (Sigma 社)
EDTA (Sigma 社)
NaCl (Nacalai tesque 社)
KCl (Sigma 社)
Na₂HPO₄ (Sigma 社)
KH₂PO₄ (和光純薬工業 (株))
D-glucose (Sigma 社)

水酸化ナトリウム (Sigma 社)
SDS (Sigma 社)
Triton X-100 (Sigma 社)
Igepal CA-630 (NP-40) (Sigma 社)
Tween 20 (Sigma 社)
Ammonium peroxodisulfate (APS) (Sigma 社)
2-メルカプトエタノール (Sigma 社)
グリセロール (Sigma 社)
Bromophenol blue sodium (BPB) (Sigma 社)
酢酸 (Sigma 社)
酢酸カリウム (Sigma 社)
Glycine (Sigma 社)
Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma 社)
Formamide (Sigma 社)
Isogen (ニッポンジーン社)
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma 社)
Ammonium Bicarbonate (富士フィルム和光純薬社)
Benzonase (Sigma 社)
Iodoacetamide (Thermo Scientific 社)
Trichloroacetic Acid (TCA) (富士フィルム和光純薬社)
Trifluoroacetic Acid (TFA) (富士フィルム和光純薬社)
Acetonitrile (ACN) (富士フィルム和光純薬社)
PhosStop phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich 社)
ジチオスレイトール (Thermo Fisher Scientific 社)
ヨードアセトアミド (Thermo Fisher Scientific 社)
トリプシン (Promega 社)
RapiGest SF (Waters 社)
GL-Tip GC (GL Sciences 社)
GL-Tip SDB (GL Sciences 社)
ヒト 20S Proteasome タンパク質 (R&D systems 社)
HRV 3C Protease (Thermo Fisher Scientific 社)

<15> 調製試薬類

純水には Milli-Q 装置で精製した水を用いた。使用した試薬は、特級試薬、生化学実験用、分子生物学実験用、あるいは細胞実験用グレードのものを所定の濃度に調製し、オートクレーブ滅菌または濾過滅菌を行ったうえで使用した。

なお、「%」の表記は、固体を液体に溶解して調製した場合には質量/体積パーセント濃度 (w/v%) を、液体を液体に溶解した場合には体積/体積パーセント濃度 (v/v%) を示すものとした。

核酸用試薬

0.5-2 M Tris/HCl 緩衝液 (pH 6.8-8.8) :

Tris 溶液を塩酸で適当な pH (6.8-8.8) に合わせ、最終的に Tris 濃度が 0.5-2 M となるよう調製した。

0.5 M EDTA (pH 8.0) :

EDTA 溶液を水酸化ナトリウム溶液で pH 8.0 に合わせ、最終的に EDTA 濃度が 0.5 M となるよう調製した。

TE 緩衝液 (pH8.0) :

10 mM	Tris/HCl (pH 8.0)
1 mM	EDTA (pH 8.0)

中性フェノール溶液 :

65°Cにて融解したフェノールに 0.1% 8-quinolinol を加えた。次に、0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) を等量加えて十分に攪拌し、水層を除去した。この操作を水層の pH が中性となるまで繰り返した。最終的に、水層を数 cm 程度残した状態で分離を終了し、得られた中性フェノール溶液を遮光瓶に入れて 4°Cで保存した。

クロロホルム/3-メチル-1-ブタノール溶液 :

クロロホルムと 3-メチル-1-ブタノールを体積比 49 : 1 で混合し、十分に攪拌して均一化したのち、遮光瓶に入れて 4°Cで保存した。

5M NaCl 溶液 :

純水に溶解し、全量を 1 l とした。

50×TAE 溶液 :

2 M	Tris
2 M	酢酸
0.05 M	EDTA

使用時は 1×濃度に希釈して使用した。

エチジウムブロマイド含有アガロースゲル：

アガロース、低融点アガロースは sigma 社のものを使用した。1×TAE 緩衝液中にアガロースが最終濃度 0.7～2%となるように溶解し、十分に加熱して均一化した後、冷却過程で 200 ml あたり 20 mg/ml エチジウムブロマイド溶液を 1 µl 添加して混和した。得られた溶液を型に流し込み、室温で固化させてゲルを作製した。

アガロース電気泳動用色素：

各制限酵素に添付されている 10×loading buffer を使用した。

制限酵素用緩衝液：

各制限酵素に添付されている 10×buffer を使用した。

アルカリミニプレップ法 I 液 (Solution I)：

50 mM	グルコース
25 mM	Tris/HCl (pH 8.0)
10 mM	EDTA (pH 8.0)

アルカリミニプレップ法 II 液 (Solution II)：

0.2 M	水酸化ナトリウム
1%	SDS

アルカリミニプレップ法 III 液 (Solution III)：

3 M	酢酸カリウム
2 M	酢酸

大腸菌の培地

LB プレート培地：

1%	Bacto Trypton
0.5%	Yeast Extract
170 mM	NaCl
1.5%	Bacto Agar
100 µg/ml	Ampicillin
25 µg/ml	Kanamycin

滅菌後約 50°Cに冷却し、抗生物質 (Ampicillin, Kanamycin) は必要に応じ

て加えて使用した。

2×YT 培地：

1.6%	Bacto Trypton
1%	Yeast Extract
86 mM	NaCl
100 µg/ml	Ampicillin
25 µg/ml	Kanamycin

抗生物質（Ampicillin, Kanamycin）は必要に応じて加えて使用した。

SOB 培地：

2%	Bacto Trypton
0.5%	Yeast Extract
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	MgSO ₄
10 mM	MgCl ₂

Bacto Trypton、Yeast Extract、NaCl、KCl を純水に溶解しオートクレーブにより滅菌後、フィルター濾過滅菌した MgSO₄、MgCl₂ 混合溶液を加えて調製した。

IPTG 溶液：

1 M の濃度となるように IPTG を純水で溶解して使用した。

Transformation Buffer (TB)：

10 mM	PIPES
250 mM	KCl
15 mM	CaCl ₂
55 mM	MnCl ₂

細胞培養用

DMEM

Sigma 社製の DMEM を使用した。FBS は 56°C、30 分の非働化を行い、HEK293、HEK293T、A549、HeLa 細胞用として FBS を 10% となるよう調製した。

McCoy's 5A

Thermo Fisher Scientific 社製の McCoy's 5A を使用した。FBS は 56°C、30 分の非働化を行い、HCT116、U2OS 細胞用として FBS を 10%となるよう調製した。

MEM

Nacalai tesque 社製の MEM を使用した。FBS は 56°C、30 分の非働化を行い、U87MG 細胞用として FBS を 10%となるよう調製した。

DMEM/Ham's F-12

Thermo Fisher Scientific 社製の DMEM/Ham's F-12 を使用した。FBS は 56°C、30 分の非働化を行い、hTERT-RPE1 細胞用として FBS を 10%となるよう調製した。

タンパク質泳動、ウエスタンブロット用試薬

SDS-PAGE 分離ゲル緩衝液：

1.5 M	Tris/HCl (pH 8.8)
0.4%	SDS

SDS-PAGE 濃縮ゲル緩衝液：

0.5 M	Tris/HCl (pH 6.8)
0.4%	SDS

10×SDS-PAGE 泳動緩衝液：

250 mM	Tris
1.92 M	Glycine
1%	SDS

1×SDS-PAGE 泳動緩衝液：

上記 10×SDS-PAGE 泳動緩衝液を 1×に希釈して使用した。

20% APS 溶液：

2 g の APS を 10 ml の純水に溶解後、-20°Cに保存した。

CBB 脱色液：

5%	メタノール
----	-------

7.5% 醋酸

300 mM NaCl 細胞溶解緩衝液：

50 mM	Tris-HCl (pH 7.6)
300 mM	NaCl
10%	glycerol
0.2%	NP-40
10 mM	iodoacetamide
10 mM	NEM
5 mM	AEBSF
10 μ M	MG132

150 mM NaCl 細胞溶解緩衝液：

150 mM	NaCl
50 mM	Tris/HCl (pH 7.5)
10%	Glycerol
0.2%	NP40

免疫沈降用洗淨緩衝液：

150 mM	NaCl
50 mM	Tris/HCl (pH 7.6)
0.1%	Triton-X 100
1 mM	Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)
10 μ g/ml	Aprotinin
10 μ g/ml	Leupeptin
400 μ M	Na_3VO_4
400 μ M	EDTA
10 mM	NaF
10 mM	Sodium pyrophosphate

GST 結合緩衝液：

300 mM	NaCl
50 mM	Tris/HCl (pH 7.6)
10%	Glycerol
5 mM	AEBSF

1×SDS サンプル緩衝液：

50 mM	Tris/HCl (pH6.8)
2%	SDS
6%	2-メルカプトエタノール
10%	グリセロール
0.1%	BPB

3×SDS サンプル緩衝液：

150 mM	Tris/HCl (pH6.8)
6%	SDS
18%	2-メルカプトエタノール
30%	グリセロール
0.1%	BPB

10×ウエスタンブロットトランスファー緩衝液：

0.25 M	Tris
1.92 M	Glycine

1×ウエスタンブロットトランスファー緩衝液：

10%となるようにメタノールを加え、10×ウエスタンブロットトランスファー緩衝液を純水にて 10 倍に希釈した。

10×TBS：

0.2 M	Tris/HCl (pH 7.6)
1.5 M	NaCl

1×TBST：

10×TBS を純水にて 10 倍に希釈し、0.05%となるように Tween 20 を加えた。

10×PBS：

1.37 M	NaCl
81 mM	Na ₂ HPO ₄
27 mM	KCl
15 mM	KH ₂ PO ₄

1×PBS :

10×PBS を純水にて 10 倍希釈して調整した。

トリプシン/EDTA 溶液 :

0.05% Trypsin

0.5 mM EDTA 2Na

以上を 1×PBS に溶解し、1 l になるように調製し、濾過滅菌した。

2×HEPES buffered saline (HBS) :

280 mM NaCl

1.5 mM Na₂HPO₄

10 mM KCl

12 mM Dextrose

50 mM HEPES

以上を純水に溶解し、1 M NaOH にて pH 7.10 に合わせ、500 ml になるように調製した後、濾過滅菌した。

3. 実験方法

<1> DNA アガロースゲル電気泳動

1×TAE 緩衝液にアガロースを最終濃度 0.7~2% となるよう溶解し、200 ml あたり 20 mg/ml エチジウムブロマイド溶液を 1 µl 添加してゲルを作製した。試料を添加後、同一の 1×TAE 緩衝液中で電気泳動を行い、泳動後は UV トランスイルミネーターを用いて DNA バンドを検出し撮影した。

<2> エタノール沈殿・イソプロパノール沈殿

核酸を含む溶液に 1/20 量の 5M 塩化ナトリウムと 2.5 倍量のエタノールを加え攪拌後、4°C、16,200×g、5 分間遠心しエタノール沈殿を行った。イソプロパノール沈殿の場合は、エタノールの代わりに 0.7 倍量のイソプロパノールを加え、同様の手順で遠心・沈殿を行った。得られた沈殿は 70%エタノールで洗浄後乾燥し、適当量の純水または TE 緩衝液に溶解して使用した。

<3> フェノール抽出・クロロホルム抽出

核酸試料からタンパク質・脂質を除去し、酵素を失活させる目的で行った。試料に等量の中性フェノールを加えて混和後、室温で 16,200×g、5 分間遠心し、水層を回収した。さらに、この回収液に等量のクロロホルム/3-メチル-1-ブタノール混合溶液を加え、再度攪拌後、同条件で遠心して水層を分離・回収した。

<4> 低融点アガロースゲルからの DNA 断片の回収

目的とする DNA 断片を含む試料を DNA ラダーマーカーとともに低融点アガロースゲルで電気泳動し、UV トランスイルミネーター下で観察後、目的バンドを清潔なカッターナイフで切り出した。切り出したゲル片を 100°C で 1 分間加熱して溶解させたのち、フェノール抽出およびクロロホルム抽出を順に行った。得られた水層をエタノール沈殿またはイソプロパノール沈殿により精製し、最終的に純水または TE 緩衝液に溶解して DNA を回収した。

<5> 大腸菌形質転換

(1) コンピテント細胞の調製

各種大腸菌を LB 寒天プレートに播種し、37°C で 14 時間培養後、単一コロニーを 25 ml の SOB 培地に接種して 37°C で 8 時間振盪培養した。100 ml の SOB 培地を 3 本用意し、それぞれに培養液を 5 ml、2 ml、1 ml ずつ加えて混合し、18°C で一晩培養した。それぞれの A_{600} 値を測定し、 $A_{600}=0.5$ 前後の培養液のみを使用（あるいはその値になるまで培養を継続）し、氷上で 10 分間冷却後、4°C、2,500×g で 10 分間遠心して菌体を回収した。菌体を氷冷した 40 ml の TB に懸濁し、10 分間静置後、再び 4°C、2,500×g で 10 分間遠心し、回収した菌体を氷冷した 10 ml の TB に懸濁した。最後に 750 μ l の DMSO を加えて穏やかに混合し、10 分間氷上で静置した後、1.5 ml チューブに 100 μ l ずつ分注して液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

(2) 形質転換

凍結コンピテント細胞を氷上で解凍し、ライゲーション反応後の DNA またはプラスミド DNA に 100 μ l の細胞を加えて氷上で 30 分間静置した。その後、42°C で 45 秒間ヒートショックを行い、再び氷上で 2 分間静置した。続いて 4 倍量の 2×YT 培地を加え、37°C で 30 分間培養した。培養後、低速遠心で菌体を回収し、適量の培地で懸濁した後、適切な抗生物質を含む LB プレートに播種して 37°C で一晩培養した。

<6> プラスミドの調製

(1) アルカリ SDS 法によるプラスミドの少量調製

プラスミド保持株の大腸菌コロニーを適切な抗生物質を含む 2 ml の 2×YT 培地に接種し、37°C、200 rpm で 8 時間培養した。培養後、4°C、16,200×g で 1 分間遠心して菌体を回収した。菌体を 200 μ l の Solution I に懸濁し、200 μ l の Solution II を加えて転倒混和した後、室温で 5 分間静置して菌体を溶解させた。続いて

200 μ l の Solution III を加えて転倒混和し中和後、4°C、16,200 $\times$ g で 5 分間遠心して上清を回収し、イソプロパノール沈殿を行った。得られた沈殿物は 70%エタノールで洗浄後乾燥させ、純水または TE 緩衝液に溶解した。

(2) キットを使用したシーケンス反应用プラスミドの少量調製

プラスミド抽出キット Fastgene plasmid mini prep kit (日本ジェネティクス社)を用いた。形質転換した大腸菌を、抗生物質を含む 2 $\times$ YT 液体培地 1.5 ml で一晚培養し、室温 (約 25°C) で 13,000 rpm、2 分間遠心して菌体を回収した。得られたペレットを、RNase A を添加した再懸濁バッファ mP1 (200 μ l) に懸濁し、ボルテックスまたはピペッティングにより十分に混和した。次いで、溶解バッファ mP2 (200 μ l) を加え、チューブを 10 回程度穏やかに転倒混合し、室温で 2 分間静置して細胞を溶解した。その後、中和バッファ mP3 (300 μ l) を加えて 10 回転倒混合し、13,000 rpm で 2 分間遠心して上清を回収した。得られた上清を FastGene mP スピニングカラムに添加し、13,000 rpm で 30 秒間遠心して DNA をカラムメンブレンに結合させた。続いて、第 1 洗浄バッファ mP4 (400 μ l) を加えて 13,000 rpm で 30 秒間遠心した後、ろ液を廃棄し、第 2 洗浄バッファ mP5 (600 μ l) で同様に洗浄した。洗浄後、メンブレンを完全に乾燥させるため、追加で 2 分間遠心を行った。DNA の溶出は、新しい 1.5 ml チューブにカラムを移し、溶出バッファ mP6 (50 μ l) をメンブレン中央に添加して 2 分間静置した後、13,000 rpm で 2 分間遠心することで行った。得られたプラスミド DNA 溶液は、シーケンス反応に供した。

(3) キットを使用した細胞トランスフェクション用プラスミドの大量調製

プラスミド抽出キット NucleoBond® Xtra Midi EF (タカラバイオ社)を用いた。形質転換した大腸菌を抗生物質を含む LB 培地 3–5 ml で 8 時間培養後、これを 1/1000 量希釈して 100–300 ml の LB 培地に接種し、37°C、約 300 rpm で 12–16 時間振とう培養した。培養液を 4°C、4,500–6,000 $\times$ g で 10 分間遠心して菌体を回収し、RNase A を添加した Resuspension Buffer RES-EF (8–12 ml) に完全に懸濁した。次いで、Lysis Buffer LYS-EF (8–12 ml) を加えて 5 回穏やかに転倒混合し、室温で 5 分間静置して溶菌させた。続いて、Neutralization Buffer NEU-EF (8–12 ml) を加えて転倒混合し、中和した後、氷上で 5 分間静置した。得られたライセートは、NucleoBond® Xtra カラムフィルターに添加してろ過・清澄化を行い、同時に DNA をカラムに結合させた。カラムは Equilibration Buffer EQU-EF で平衡化した後、Filter Wash Buffer FIL-EF (5–10 ml)、Wash Buffer ENDO-EF (35–90 ml)、および Wash Buffer WASH-EF (15–45 ml) で順次洗浄した。洗浄後、Elution Buffer ELU-EF (5–15 ml) を用いてプラスミド DNA を溶出した。溶出液に対し、等量

の室温イソプロパノール（約 3.5–10.5 ml）を加えて混合し、15,000×g、4°Cで 30 分間遠心して DNA を沈殿させた。得られた DNA ペレットをエンドトキシンプリー70%エタノール（2–5 ml）で洗浄し、15,000×g で 5 分間遠心後、室温で乾燥させた。最後に、TE-EF バッファーまたはエンドトキシンプリー水（適量、通常 100–200 µl）に溶解し、DNA 濃度を分光光度計で測定した。

<7> 塩基配列の決定

塩基配列は ABI SeqStudio (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて解析した。PCR 反応は、BigDye Terminator Kit のプレミックス溶液 4 µl、5×シーケンス緩衝液 2 µl、DNA 400 ng、プライマー1.6 pmol を混合し、純水で最終体積を 20 µl とした。PCR 条件は、96°Cで 10 秒、50°Cで 5 秒、60°Cで 4 分を 1 サイクルとし、これを 25 サイクル繰り返した。反応後、PCR 産物をエタノール沈殿により回収し、沈殿物を 70%エタノールで洗浄後乾燥させ、25 µl の Formamide (Sigma 社) に溶解した。溶解後、95°Cで 2 分間熱変性し、氷上で急冷した試料を用いて ABI SeqStudio にて配列決定を行った。得られたデータは、付属ソフトウェアを用いて解析した。

<8> オリゴヌクレオチドの合成

Integrated DNA Technologies 社に依頼して合成した。合成したオリゴヌクレオチドは以下の通りである。

ヒト PPM1D、NQO1 遺伝子クローニング用

HsPPM1D sense1	5'-ATGACAAGgGCGGCCGCatggcggggctgtactcgctg-3'
HsPPM1D sense2	5'-ATGACAAGgGCGGCCGCactgacagcccttctataat-3'
HsPPM1D sense3	5'-CAGGGGCCCTGGGATCCatggcggggctgtactcgctg-3'
HsPPM1D sense4	5'-ATGACAAGgGCGGCCGCttagaggttcagctgagata-3'
HsPPM1D sense5	5'-ATGACAAGgGCGGCCGCaatcaacaacactgtcatg-3'
HsPPM1D antisense1	5'-GGGGGGGGCGCTCGAGtcacaggttcaggtataactcatc-3'
HsPPM1D antisense2	5'-GGGGGGGGCGCTCGAGtcagcaaacacaaacagtttt-3'
HsPPM1D antisense3	5'-GATGCGGCCGCTCGAGtcagcaaacacaaacagtttt-3'
HsPPM1D antisense4	5'-GGGGGGGGCGCTCGAGtcaggtgtgtgggagacttgc-3'
HsPPM1D antisense5	5'-GGGGGGGGCGCTCGAGtcaaggggttcttcaatttcttg-3'
HsNQO1 sense1	5'-AATTGATCCGCGGCCGCatggtcggcagaagagcactg-3'
HsNQO1 antisense1	5'-GGGGGGGGCGCTCGAGtcattttctagctttgatctg-3'

<9> 遺伝子クローニング用 PCR

酵素は KOD FX を使用し、下記の組成で PCR 反応液を作成した。

KOD FX を利用した PCR 反応液組成（総液量：50 μ l）

テンプレート DNA	100 ng
各プライマー	各 0.3 μ M
2 $\times$ PCR 緩衝液	25 μ l
dNTPs	各 0.4 mM
KOD FX DNA polymerase	1 U
滅菌水	

PCR 反応条件

目的とする反応産物に応じて、下記の（1）または（2）の条件を使用した。

条件（1）：

(94°C、1 分→68°C、30 秒→72°C、1 分) $\times$ 2 サイクル→
(94°C、1 分→66°C、30 秒→72°C、1 分) $\times$ 3 サイクル→
(94°C、1 分→64°C、30 秒→72°C、1 分) $\times$ 4 サイクル→
(94°C、1 分→62°C、30 秒→72°C、1 分) $\times$ 5 サイクル→
(94°C、1 分→60°C、30 秒→72°C、1 分) $\times$ 6 サイクル→
(94°C、1 分→56°C、30 秒→72°C、1 分) $\times$ 25 サイクル

条件（2）：

(94°C、1 分→68°C、30 秒→72°C、2 分) $\times$ 2 サイクル→
(94°C、1 分→66°C、30 秒→72°C、2 分) $\times$ 3 サイクル→
(94°C、1 分→64°C、30 秒→72°C、2 分) $\times$ 4 サイクル→
(94°C、1 分→62°C、30 秒→72°C、2 分) $\times$ 5 サイクル→
(94°C、1 分→60°C、30 秒→72°C、2 分) $\times$ 6 サイクル→
(94°C、1 分→56°C、30 秒→72°C、2 分) $\times$ 25 サイクル

ヒト PPM1D cDNA（pQCXIP-FLAG-PPM1D-N 用）の PCR 反応条件

テンプレート DNA	Human cDNA Library mix
5'プライマー	HsPPM1D sense1
3'プライマー	HsPPM1D antisense1
反応条件	条件（1）

ヒト PPM1D cDNA（pQCXIP-FLAG-PPM1D-C 用）の PCR 反応条件

テンプレート DNA	Human cDNA Library mix
------------	------------------------

5'プライマー	HsPPM1D sense2
3'プライマー	HsPPM1D antisense2
反応条件	条件 (1)

ヒト PPM1D cDNA (pGEX6P1-PPM1D 用) の PCR 反応条件

テンプレート DNA	Human cDNA Library mix
5'プライマー	HsPPM1D sense3
3'プライマー	HsPPM1D antisense3
反応条件	条件 (2)

ヒト PPM1D (450-605) cDNA (pQCXIP-FLAG-PPM1D(450-605)用) の PCR 反応条件

テンプレート DNA	Human cDNA Library mix
5'プライマー	HsPPM1D sense4
3'プライマー	HsPPM1D antisense2
反応条件	条件 (1)

ヒト PPM1D (502-605) cDNA (pQCXIP-FLAG-PPM1D(502-605)用) の PCR 反応条件

テンプレート DNA	Human cDNA Library mix
5'プライマー	HsPPM1D sense5
3'プライマー	HsPPM1D antisense2
反応条件	条件 (1)

ヒト PPM1D (396-570) cDNA (pQCXIP-FLAG-PPM1D(396-570)用) の PCR 反応条件

テンプレート DNA	Human cDNA Library mix
5'プライマー	HsPPM1D sense2
3'プライマー	HsPPM1D antisense4
反応条件	条件 (1)

ヒト PPM1D (396-530) cDNA (pQCXIP-FLAG-PPM1D(396-530)用) の PCR 反応条件

テンプレート DNA	Human cDNA Library mix
5'プライマー	HsPPM1D sense2
3'プライマー	HsPPM1D antisense5

反応条件

条件 (1)

ヒト NQO1 cDNA (pQCXIP-FLAG-NQO1 用) の PCR 反応条件

テンプレート DNA	Human cDNA Library mix
5'プライマー	HsNQO1 sense1
3'プライマー	HsNQO1 antisense1
反応条件	条件 (1)

<10> サブクローニング

(1) Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) 処理ベクターDNA の調製

ベクターDNA を各制限酵素により完全に分解し、CIAP による 5'末端の脱リン酸化を行った。また必要に応じて Klenow fragment による平滑末端化を行った。

(2) インサート DNA の調製

インサート DNA は、低融点アガロースゲルで分離し、目的断片を回収して使用した。

(3) In-Fusion 反応

上記で調製したベクターDNA 100 ng とインサート DNA 100 ng を混合し、等量の 5×In-Fusion HD Enzyme Premix (In-Fusion® Snap Assembly Master Mix) を加え、Total 10 µl、50°Cで 15 分静置した。

(4) 各コンストラクトの作製

pQCXIP-FLAG-PPM1D-N、pQCXIP-FLAG-PPM1D-C

pQCXIP-FLAG-PPM1D (450-605), pQCXIP-FLAG-PPM1D (502-605)

pQCXIP-FLAG-PPM1D (396-570), pQCXIP-FLAG-PPM1D (396-530)

pQCXIP-NQO1

前記 PCR で得られ、低融点アガロースゲルによって精製した PCR 産物を、ヒト PPM1D 遺伝子は NotI、XhoI 処理した pQCXIP-FLAG ベクターと In-Fusion 反応を行った。ヒト NQO1 遺伝子は NotI、XhoI 処理した pQCXIP ベクターと In-Fusion 反応を行った。

pGEX6P1-PPM1D

前記 PCR で得られ、低融点アガロースゲルによって精製した PCR 産物を、BamHI、XhoI 処理した pGEX6P1 ベクターと In-Fusion 反応を行った。

<11> タンパク質のポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

Mini-PROTEAN TGX Gels、SDS-PAGE 泳動緩衝液を用いて、150 V の定電圧でおよそ 50 分を行った。

<12> Coomassie brilliant blue (CBB) 染色

泳動後、ゲルを CBB 染色液に室温で 30 分間浸した。その後純水で数回洗浄し、脱色液に浸し、背景と比べてタンパク質のバンドが鮮明になるまで洗浄を続けた。

<13> ウェスタンブロット

ウェットタイプのウェスタンブロット装置を使用した。PVDF 膜は事前にメタノールに 1~2 分間浸し、その後転写緩衝液と濾紙と共に浸した。電気泳動後、ゲルを取り出し、ウェスタンブロット装置において、陽極側から順にスポンジ→濾紙→PVDF 膜→ゲル→濾紙→スポンジの順に重ね、100 V の低電圧で 60 分間転写した。転写後、PVDF 膜をブロッキング溶液に浸し、室温で 30 分以上振盪した。ブロッキング後は TBST で 3 回洗浄し、TBST で希釈した 1 次抗体希釈液に浸して、4°C で一晩、または室温で 2 時間抗体反応を行った。1 次抗体反応後、TBST で 5 分間×3 回洗浄し、TBST で希釈した 2 次抗体希釈液に浸して室温で 2 時間反応した。その後、TBST で 5 分間×3 回洗浄し、ECL Western Blotting Detection Reagents を用いて化学発光反応を行い、X 線フィルムに露光して検出した。

<14> 細胞の継代培養

全ての細胞は、CO₂ インキュベーター内で、5% CO₂、37°C の条件で培養した。HEK293、HEK293T、A549、HeLa 細胞は FBS を 10% 添加した DMEM で、HCT116 細胞、U2OS 細胞は FBS を 10% 添加した McCoy's 5A medium で、U87MG 細胞は FBS を 10% 添加した MEM で、hTERT-RPE1 細胞は FBS を 10% 添加した DMEM/Ham's F-12 で培養した。継代は、70-90%コンフルエントとなった細胞の培地を吸引除去し、培地の約 1/4 量の PBS で洗浄した。洗浄後 PBS を吸引し、培地の約 1/10 量のトリプシン/EDTA 溶液加えて 37°C、5 分間静置し、細胞が底面から剥離したことを顕微鏡観察により確認後、培地をトリプシン/EDTA 溶液の 10 倍量加えて中和し、この細胞懸濁液の 1/10~1/20 量を、予め培地を分注しておいたディッシュに加え均一になるよう懸濁し、5% CO₂、37°C で培養した。

<15> リポフェクション法を用いた細胞への遺伝子導入

PEI MAX 試薬 (Polysciences 社) を用いた。遺伝子導入を行う細胞をあらかじめ 10 cm ディッシュに播き、一晩培養した。導入する DNA をそれぞれ 10 µg 分

注し、DMEM で総量が 500 μ l になるよう調整した。作製した DNA 混合液に PEI MAX を 25 μ g 加え、15 分間室温で静置後、細胞に滴下した。導入後は、5% CO₂、37°C で培養した。

<16> レトロウイルスを用いた安定発現細胞株作成

HEK293T 細胞をウイルスパッケージング細胞として 10 cm ディッシュに播き、リポフェクション法によりレトロウイルスベクターと pCL10A1 を導入した。感染の標的する細胞は導入前に 10 cm ディッシュに 15~30%コンフルエントで播いておいた。導入から 48 時間後、パッケージング細胞の上清を回収しフィルターで濾過後、Polybrene を最終濃度 8 μ g/ml に調整して感染細胞の培地と交換し、レトロウイルスを感染させた。さらに 48 時間培養した後、適当な抗生物質を含む培地に置換し、1 週間程度培地交換または継代培養を繰り返すことで、安定発現細胞株を樹立した。

<17> 細胞溶解液の調製

細胞はディッシュからトリプシン/EDTA 溶液またはセルスクレイパーで剥離し、15 ml チューブに回収後、4°C、2,500 $\times$ g で 5 分間遠心して沈殿させた。沈殿した細胞は 1 ml の PBS で懸濁し、1.5 ml チューブに移して再度 4°C、2,500 $\times$ g で 5 分間遠心し上清を除去した。直ちに溶解を行わない場合は、この状態で-80°C で保存した。細胞溶解には、300 mM NaCl または 150 mM NaCl を含む細胞溶解緩衝液を用い、細胞内タンパク質を可能な限り回収する場合は、直接 1 $\times$ SDS サンプル緩衝液を添加して氷上で溶解した。懸濁後、超音波破碎機を用いて凝集塊が見えなくなるまで数秒間破碎し、15 分間氷上で静置した。1 $\times$ SDS サンプル緩衝液を使用した場合はそのままヒートブロックで 100°C、5 分間加熱し、使用まで-20°Cで保存した。それ以外の緩衝液を用いた場合は 4°C、16,200 $\times$ g で 15 分間遠心して上清を回収し、SDS-PAGE 用試料として使用する場合は 1/2 量の 3 $\times$ SDS サンプル緩衝液を加え、同様にヒートブロックで 100°C、5 分間加熱し、使用まで-20°Cで保存した。免疫沈降に用いる場合の手順は下記に記述する。

<18> 免疫沈降実験

前項で得られた細胞溶解液のうち、1/20 量を別の 1.5 ml チューブに移し、1/2 量の 3 $\times$ SDS サンプル緩衝液を加え、ヒートブロックで 100°C、5 分間加熱後、使用まで-20°Cで保存した。残りの溶解液は 1000 μ l ずつ、50 μ l の 50% (v/v) FLAG M2 agarose を加え、4°Cで 1 時間転倒混和した後、4°C、4,000 rpm で 1 分間遠心して上清を除去する操作を、溶解液がなくなるまで繰り返した。その後、4°C、

6,000 rpm で 10 秒間遠心、上清を除去し、800 μ l の免疫沈降用洗浄緩衝液で懸濁する操作を 5 回行った。続いて、免疫沈降用洗浄緩衝液で希釈した 1 $\times$ FLAG ペプチドを 100 μ l 加え、氷上で 10 分間溶出させた。溶出液を回収し、同様の操作を再度行い、合計 200 μ l の溶出液を得た。100 μ l は質量分析用に-80 $^{\circ}$ Cで保存し、残りの 100 μ l には 1/2 量の 3 $\times$ SDS サンプル緩衝液を加え、ヒートブロックで 100 $^{\circ}$ C、5 分間加熱し、使用まで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

<19> Cycloheximide を用いた細胞内タンパク質分解実験

Cycloheximide は真核細胞のタンパク質翻訳阻害剤である。この性質を利用して、転写翻訳の影響を排した状態での目的タンパク質の半減期を調べることができる。具体的には、50 μ g/ml の cycloheximide 処理をした細胞を経時的に回収しそれぞれ細胞溶解液を調製し、目的のタンパク質に対してウエスタンブロットを行った。この際、半減期が観察する期間内よりも十分に長いタンパク質（本研究では vinculin や GAPDH を用いた）を内部標準として同時にウエスタンブロットを行った。また、半減期が観察する期間内で検出可能なタンパク質（本研究では c-Myc を用いた）を陽性対照として同時にウエスタンブロットを行った。

<20> 阻害剤を用いた細胞内タンパク質量測定実験

MG132 (10 μ M) および Carfilzomib (10 μ M) をプロテアソーム阻害剤として、Bafilomycin A1 (10 nM) および Chloroquine (50 μ M) をリソソーム阻害剤、TAK-243 (250 nM) をユビキチン活性化酵素 E1 阻害剤として併記した濃度で用いた。各阻害剤処理をした細胞を所定の時間後に回収しそれぞれ細胞溶解液を調製し、目的のタンパク質に対してウエスタンブロットを行った。この際、Vinculin または GAPDH を内部標準として同時にウエスタンブロットを行った。また、ユビキチン化およびプロテアソーム依存的に分解を受けるタンパク質（本研究では c-Myc を用いた）およびリソソーム依存的に分解を受けるタンパク質（本研究では NCOA4 を用いた）を陽性対照として同時にウエスタンブロットを行った。

<21> 質量分析用サンプル調製

免疫沈降後の溶出したペプチドを真空遠心で乾燥させ、還元 (55 mM ジチオスレイトール、95 $^{\circ}$ Cで 5 分間)、アルキル化 (10 mM ヨードアセトアミド、室温、暗所で 20 分間) 後、0.01% RapiGest SF 存在下でトリプシン (50 ng/ μ l、37 $^{\circ}$ Cで一晩) で消化をした。トリプシン消化後、TFA で酸性化し、GL-Tip GC および GL-Tip SDB を用いて固相抽出を行い脱塩した。

<22> 質量分析

脱塩したトリプシン消化物は、EASY-nLC 1000 にオンライン接続した Orbitrap Elite により分析した。移動相は、0.1%ギ酸/水（溶媒 A）と 0.1%ギ酸/100%アセトニトリル（溶媒 B）を用い、ペプチドを C18 Reprosil 分析カラムにロードし、300nL/min の一定流速で 150 分間の 2 段階グラジエント（溶媒 B の 0~35% 130 分、35~100% 5 分、100% 15 分）により分離した。イオン化には、液絡電圧 1.6 kV、キャピラリー温度 200°Cを使用した。Orbitrap Elite 装置は、Xcalibur ソフトウェアを使用して、データ依存の MS/MS モードで操作し、m/z 400 で 120,000 の分解能で取得したサーベイスキャンを使用した。2 から 4 の電荷を持つ最も豊富な上位 10 個の同位体パターンを、2.0 m/z の分離ウィンドウでサーベイスキャンから選択し、規格化衝突エネルギー35 で衝突誘起解離により断片化した。サーベイスキャンと MS/MS スキャンの最大イオン注入時間は 60ms で、イオンターゲット値は 1e6 に設定した。

<23> 質量分析データからのタンパク質の同定

Proteome Discoverer ソフトウェアを使用してピークリストを生成した。MS/MS スペクトルは SequestHT 検索エンジンを使用して UniProt ナレッジベース（バージョン 2017_10）に対して検索した。プリカーサーおよびフラグメントの質量公差はそれぞれ 10ppm および 0.6Da に設定した。メチオニン酸化、タンパク質アミノ末端アセチル化、Asn/Gln 脱アミド化、Ser/Thr/Tyr リン酸化、Lys 側鎖のジグリシン修飾、Cys カルバミドメチル修飾をデータベース検索用の可変修飾としてセットした。ペプチドの同定は 1%の偽発見率でフィルタリングした。ラベルフリー定量（LFQ）は、プリカーサーイオン定量ノードのプリカーサーイオンの強度を用いて計算した。各サンプルの全ペプチドの存在量の合計が同じになるように正規化を行った。

<24> siRNA ノックダウン

HEK293T 細胞を 6 cm ディッシュに 5×10^5 数ずつ播種し、10 nM の siRNA を Lipofectamine RNAiMAX を使用して導入した。48 時間後に細胞を回収し、1×SDS サンプル緩衝液を添加して細胞を氷上で溶解した。各緩衝液を加えて懸濁した後、超音波破碎機にて凝集塊が見えなくなるまで数秒間破碎後、15 分間氷上で静置した。1×SDS サンプル緩衝液を用いた場合はそのままヒートブロックにて 100°C、5 分間加熱し、使用時まで -20°Cで保存した。siRNA は、silencer select siRNA を使用した。

<25> リコンビナント PPM1D タンパク質の作製

pGEX6P1-PPM1D で大腸菌を形質転換し、LB-Ampicillin プレート培地に播種した。コロニーをピックアップし、37°Cで 100 ml の 2×YT 培地で 14 時間培養した。900 ml の 2×YT 培地を加えて、さらに 3 時間培養後、IPTG を終濃度 0.2 mM となるように添加し、18°Cで 20 時間培養を行った。回収した大腸菌を、30 ml の GST 結合緩衝液で懸濁し、French pressure cell press で破碎した。4°C、16,200×g、10 分間で遠心して上清を回収し、沈殿物が出現しなくなるまでこれを繰り返した。50% (v/v) の Glutathione Sepharose Beads 4B を 1000 µl 添加し、4°C、2 時間転倒混和した。GST 結合緩衝液で 5 回洗浄後、GST-HRV3C プロテアーゼを添加し、4°Cで一晩転倒混和した。翌日上清を回収した試料で SDS-PAGE、CBB 染色を行い、リコンビナント PPM1D タンパク質の作製を評価した。

<26> In vitro degradation アッセイ

0.25 µg の 20S Proteasome タンパク質と 2 ng のリコンビナント PPM1D を In vitro degradation アッセイ緩衝液中に混ぜ、30°Cで一時間静置した。その後、1/2 量の 3×SDS サンプル緩衝液を加え、ヒートブロックにて 100°C、5 分間加熱し、使用時まで-20°Cで保存し、ウエスタンブロット解析を行った。

<27> 細胞生存率アッセイ

細胞生存率は、Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。各ウェルに培地 100 µl 中に 1×10^4 個の細胞を播種し、37°Cで 48 時間培養した。その後、ボルテゾミブ、GSK2830371、または両者をそれぞれの濃度で添加し、37°Cでさらに 48 時間培養した。培養後、各ウェルに Cell Counting Kit-8 試薬を 10 µl 添加し、37°Cで 1 時間培養した。吸光度は SpectraMax Paradigm を用いて 450 nm で測定した。薬剤非添加の対照群に対する吸光度の割合をもって生存率を算出した。

<28> 薬剤併用効果の評価

ボルテゾミブと GSK2830371 の併用効果は、CompuSyn ソフトウェア (ComboSyn 社) を用い、Chou-Talalay 法(Chou and Talalay, 1984)に基づいて解析した。各薬剤の単剤における IC₅₀ 値から算出した固定モル比で薬剤を組み合わせ、各効果レベル (fraction affected, Fa) における併用指数 (combination index, CI) を求めた。CI<1 を相乗効果、CI=1 を相加効果、CI>1 を拮抗効果と判定した。CompuSyn ソフトウェアにより、自動的に median-effect プロット、CI-Fa プロット、isobologram を作成した。

<29> ボルテゾミブ耐性細胞株の樹立

ボルテゾミブ耐性細胞株は、親株細胞をボルテゾミブを含む培地で連続培養

することで樹立した。ボルテゾミブ濃度は 10～100 nM の範囲で 5 nM ずつ段階的に上昇させ、合計 30 日間培養した。細胞は 2～3 日に 1 回継代し、過度の高密度を避けて維持した。30 日後、最も高濃度のボルテゾミブ存在下で生存した細胞を回収し、耐性株として保存した。耐性の確認は、親株細胞と同様の方法で Cell Counting Kit-8 を用いて細胞生存率アッセイを行い、ボルテゾミブ処理 48 時間後の IC₅₀ 値を算出し、親株との比較により評価した。

実験結果

1. PPM1D は短寿命タンパク質である

まず、PPM1D の分解機構に関与する領域を推定することを目的として、野生型および複数の変異体 PPM1D について、細胞内における安定性を cycloheximide (CHX) chase assay により評価した。

本実験で使用した PPM1D の各アミノ酸配列を図 3A に示す。HEK293T 細胞および HeLa 細胞は野生型 PPM1D を発現している。HCT116 細胞および U2OS 細胞は、PPM1D 遺伝子にナンセンス変異をヘテロ発現しており、野生型 PPM1D と C 末端欠損変異 PPM1D の双方を有している。また、PPM1D の N 末端領域 (FLAG-PPM1D-N) または C 末端領域 (FLAG-PPM1D-C) を安定に過剰発現させた HEK293T 細胞株を樹立した。

CHX chase assay の結果、HEK293T 細胞および HeLa 細胞において野生型 PPM1D は細胞内で速やかに分解された (図 3B, C)。

HCT116 および U2OS 細胞において、先行研究では C 末端欠損変異 PPM1D が野生型に比して高い安定性を示すことが報告されている (Kleiblova *et al.*, 2013)。本研究でも同様に、C 末端欠損変異 PPM1D は野生型に比べて細胞内で安定化していることが確認された (図 3D, E)。

さらに、FLAG-PPM1D-C は野生型 PPM1D よりも速やかに分解されることが明らかとなった (図 3F, G)。これらの結果から、PPM1D の C 末端領域がタンパク質の安定性および分解制御において重要な役割を担っていることが示唆された。

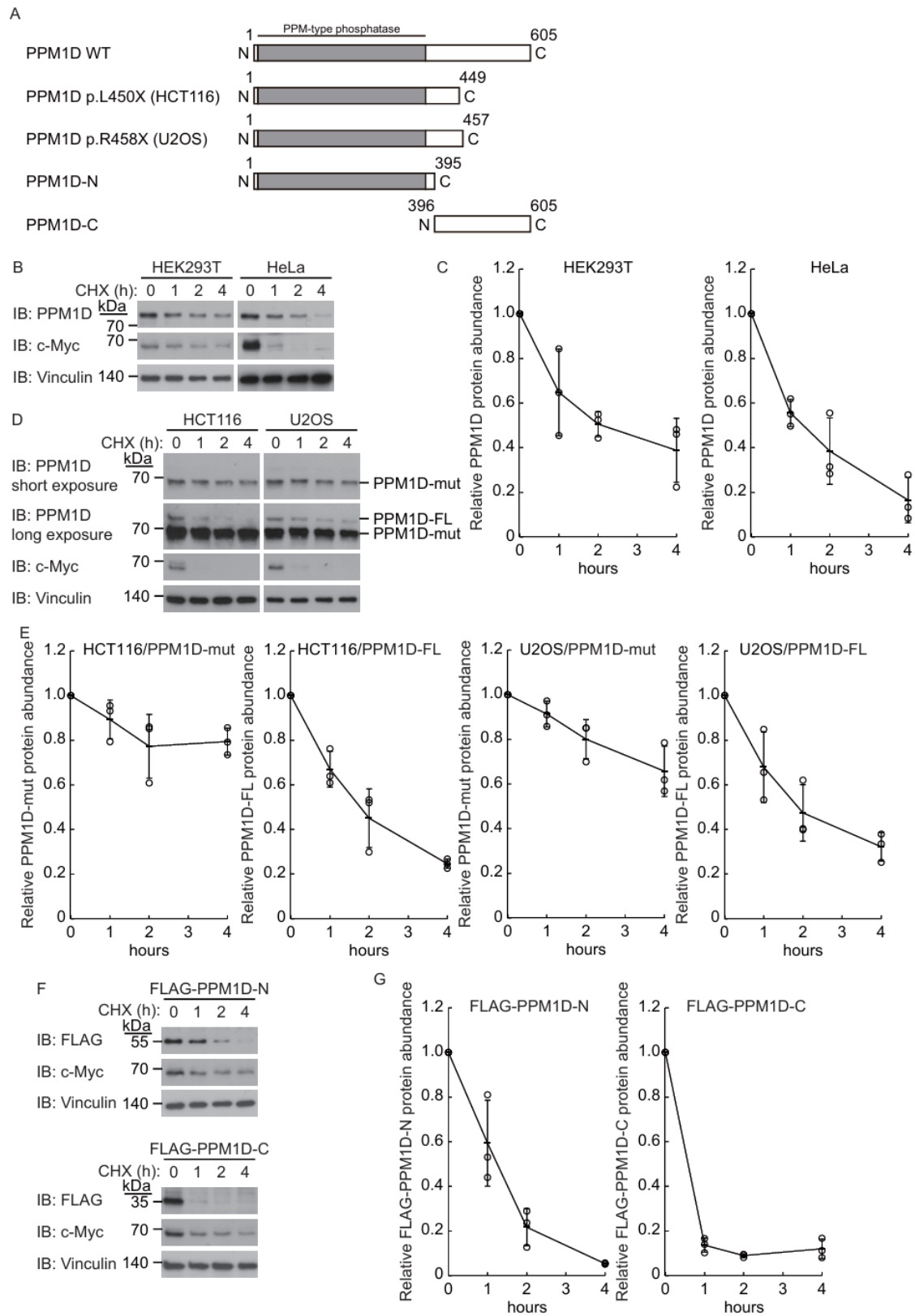


図 3. PPM1D は短寿命タンパク質であり、C 末端領域が安定性に影響を与える

A 本研究で使用した野生型および変異型 PPM1D 構築体の模式図。
B, C HEK293T 細胞および HeLa 細胞を用いた CHX chase assay ($n=3$)。PPM1D タンパク質の代表的なウエスタンブロット像 (B) および定量結果 (C) を示す。細胞は CHX 50 $\mu\text{g/ml}$ 存在下で、各時間培養した。
D, E HCT116 細胞および U2OS 細胞を用いた CHX chase assay ($n=3$)。PPM1D の C 末端欠損変異 (PPM1D-mut) および全長型 (PPM1D-FL) の代表的なウエスタンブロット像 (D) および定量結果 (E) を示す。細胞は CHX 50 $\mu\text{g/ml}$ 存在下で、各時間培養した。
F, G FLAG タグ付き PPM1D の N 末端領域 (FLAG-PPM1D-N) または C 末端領域 (FLAG-PPM1D-C) を安定発現させた HEK293T 細胞を用いた CHX chase assay ($n=3$)。PPM1D 変異体タンパク質の代表的なウエスタンブロット像 (F) および定量結果 (G) を示す。細胞は CHX 50 $\mu\text{g/ml}$ 存在下で、各時間培養した。タンパク質量は vinculin に対して正規化した。定量データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

2. PPM1D はプロテアソーム依存的分解を受ける

PPM1D がプロテアソーム、リソソームのいずれによって分解を受けるか明らかにするために、プロテアソーム阻害剤 (MG132、Carfilzomib) およびリソソーム阻害剤 (Bafilomycin A1、Chloroquine) で各種細胞を処理し、PPM1D 発現量の変化を測定した。対照実験として、リソソーム経路で分解されることが知られている NCOA4 がリソソーム阻害剤処理により蓄積すること、またユビキチン化依存的および非依存的な機構の双方を介してプロテアソーム分解を受ける c-Myc が、プロテアソーム阻害剤処理により蓄積することを確認した (Murai *et al.*, 2018; Mancias *et al.*, 2014; Salghetti *et al.*, 1999)。

野生型 PPM1D を発現している HEK293T 細胞および HeLa 細胞では野生型 PPM1D はプロテアソーム阻害剤処理によって蓄積し、リソソーム阻害剤処理では変化がなかった (図 4A, B)。

次に野生型 PPM1D と C 末端欠損変異 PPM1D をヘテロ発現している HCT116 細胞および U2OS 細胞では、プロテアソーム阻害剤処理によって野生型 PPM1D は同様の蓄積を認め、C 末端欠損変異 PPM1D は野生型 PPM1D の変化に比べて軽度の蓄積を認め、リソソーム阻害剤処理では両者ともに変化がなかった (図 4C, D)。

FLAG-PPM1D-N または FLAG-PPM1D-C を過剰発現させた HEK293T 細胞では、プロテアソーム阻害剤処理により FLAG-PPM1D-N はゆるやかな蓄積を、

FLAG-PPM1D-C は多量の蓄積をみとめ、リソソーム阻害剤処理では変化がなかった (図 4E, F)。

以上のことから PPM1D の分解はプロテアソーム依存的に制御されており、そのメカニズムとして、PPM1D の C 末端が特に重要な役割を担っていることが示唆された。

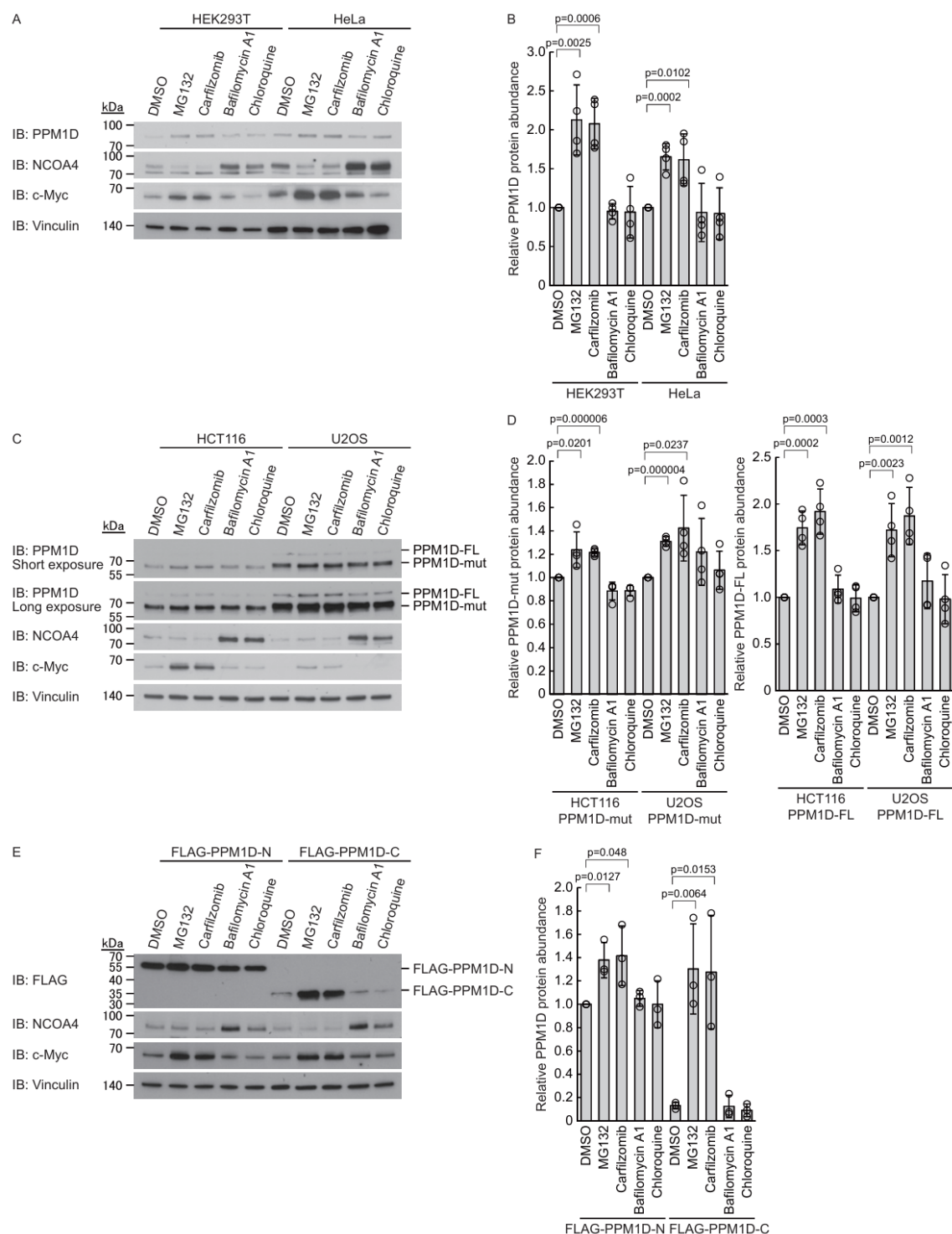


図 4. PPM1D はプロテアソーム依存的分解を受ける

A, B HEK293T 細胞および HeLa 細胞を、DMSO を溶媒対照として、MG132 (10 μ M)、Carfilzomib (10 μ M)、Bafilomycin A1 (100 nM)、Chloroquine (50 μ M) で 3 時間処理した (n=3)。PPM1D タンパク質の代表的なウエスタンブロット像 (A) および定量結果 (B) を示す。

C, D HCT116 細胞および U2OS 細胞を同様に 3 時間処理した (n=3)。PPM1D の全長型 (PPM1D-FL) および C 末端欠損変異 (PPM1D-mut) の代表的なウェスタンブロット像 (C) および定量結果 (D) を示す。

E, F FLAG-PPM1D-N または FLAG-PPM1D-C を安定発現させた HEK293T 細胞を同様に 3 時間処理した (n=3)。代表的なウェスタンブロット像 (E) および定量結果 (F) を示す。

タンパク質量は vinculin に対して正規化した。定量データは平均値±標準偏差で示した。

3. PPM1D は N 末端と C 末端の異なる経路で分解され、C 末端のユビキチン化が C 末端のユビキチン非依存的分解を阻害する

PPM1D のプロテアソーム依存的な分解がユビキチン化に依存しているか検証するために、ユビキチン活性化酵素 E1 阻害剤 (TAK-243) で各種細胞を処理し、PPM1D 量の変化を測定した。

HEK293T 細胞および HeLa 細胞では野生型 PPM1D は E1 阻害剤処理によって変化しなかった (図 5A, B)。HCT116 細胞および U2OS 細胞では、E1 阻害剤処理によって野生型 PPM1D は変化せず、C 末端欠損変異 PPM1D は HCT116 のみ増加をみとめた (図 5C, D)。このことから、HCT116 細胞における C 末端欠損変異 PPM1D の安定性には、ユビキチン依存的分解機構が部分的に関与することが示唆された。FLAG-PPM1D-N または FLAG-PPM1D-C を過剰発現させた HEK293T 細胞では、E1 阻害剤処理により FLAG-PPM1D-N はゆるやかに蓄積したのに対し、FLAG-PPM1D-C ではむしろ減少した (図 5E, F)。

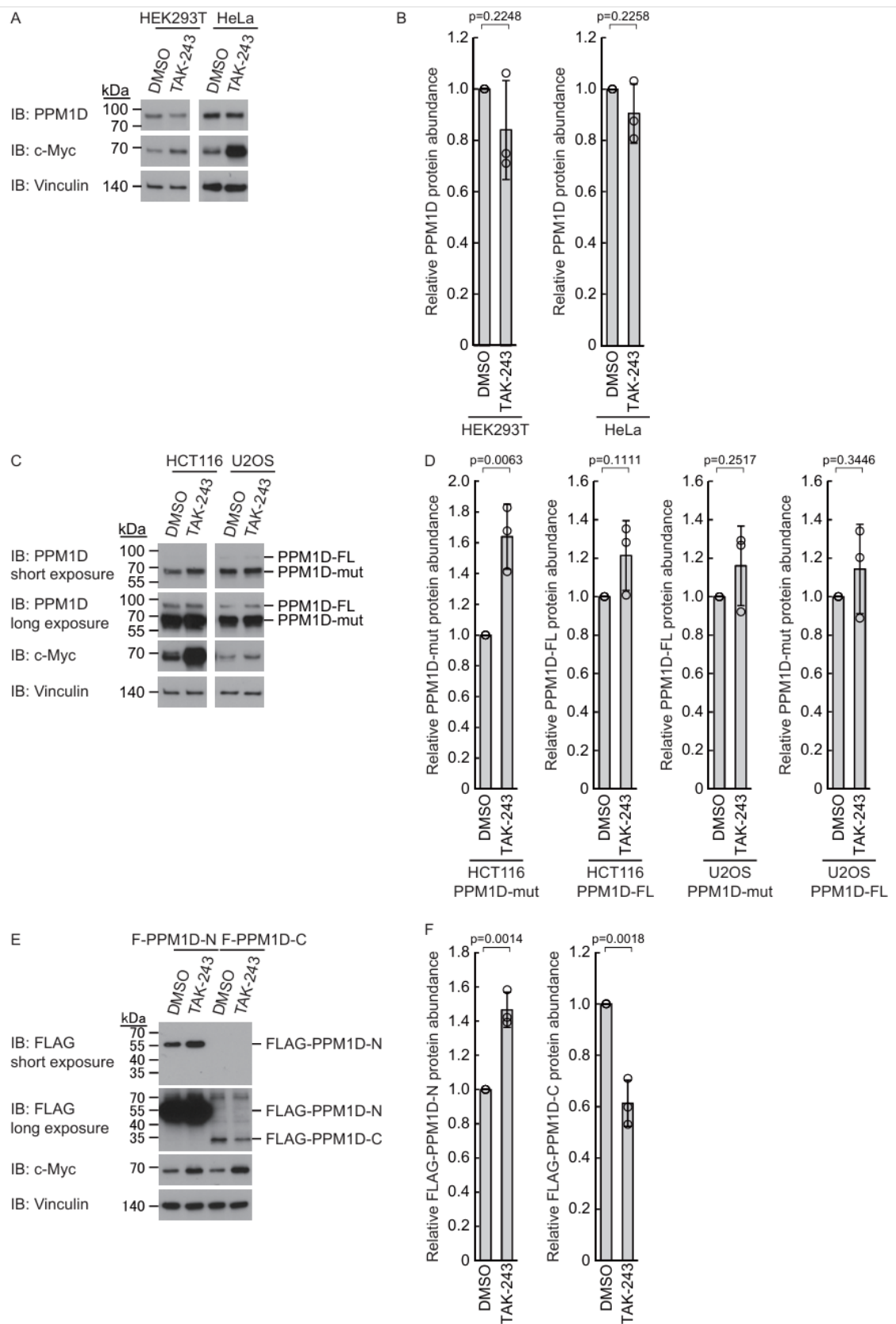


図 5. PPM1D の C 末端領域はユビキチン非依存的プロテアソーム依存的分解を

受ける

A, B HEK293T 細胞および HeLa 細胞を、DMSO を溶媒対照として E1 ユビキチン活性化酵素阻害剤 TAK-243 (250 nM) で 3 時間処理した (n=3)。PPM1D タンパク質量の代表的なウエスタンブロット像 (A) および定量結果 (B) を示す。

C, D HCT116 細胞および U2OS 細胞を、DMSO を溶媒対照として TAK-243 (250 nM) で 3 時間処理した (n=3)。PPM1D の全長型 (PPM1D-FL) および変異型 (PPM1D-mut) の代表的なウエスタンブロット像 (C) および定量結果 (D) を示す。

E, F FLAG-PPM1D-N または FLAG-PPM1D-C を過剰発現する HEK293T 細胞を、DMSO を溶媒対照として TAK-243 (250 nM) で 3 時間処理した (n=3)。PPM1D 変異体の代表的なウエスタンブロット像 (E) および定量結果 (F) を示す。タンパク質量は vinculin に対して正規化した。定量データは平均値±標準偏差で示した。

次に、ユビキチン化を阻害した条件下でのプロテアソーム依存的分解の程度を評価するため、TAK-243 と MG132 で同時に処理した。HEK293T 細胞では、E1 単独阻害では変化しなかった野生型 PPM1D が、MG132 単独処理と同程度に蓄積した (図 6A, B)。この結果は、野生型 PPM1D の分解が主として UbInPD 経路によって制御されていること、あるいはユビキチン化阻害によってユビキチン非依存的分解が代償的に亢進することが示唆している。

FLAG-PPM1D-N を過剰発現する HEK293T 細胞では、E1 単独阻害による蓄積が TAK-243 と MG132 の併用処理によってさらに増強されることはなかった (図 6C, D)。これは、FLAG-PPM1D-N の分解が主としてユビキチン化依存的に進行していることを示唆している。

一方、FLAG-PPM1D-C を過剰発現する HEK293T 細胞では、E1 阻害単独でみられた FLAG-PPM1D-C の減少が、TAK-243 と MG132 の併用処理により MG132 単独処理と同程度に回復した (図 6E, F)。これは、ユビキチン化阻害によりユビキチン化非依存的プロテアソーム依存的分解が代償的に亢進することを示している。

また、HCT116 細胞でも、野生型 PPM1D は HEK293T 細胞と同様の変化を示し、C 末端欠損変異 PPM1D は FLAG-PPM1D-N と同様の変化を示した (図 6G, H)。したがって、C 末端欠損変異 PPM1D の分解は主としてユビキチン化依存的機構によって制御されていることを示している。

さらに、PPM1D-C を基に作製した一連の C 末端断片 (図 6I) を HEK293T 細胞に導入し、同様の解析を行った。PPM1D (450–605) は、PPM1D-C と同様に E1 単独阻害により発現量が減少し、MG132 併用処理で回復した (図 6J, K)。一

方、PPM1D (502–605) では E1 阻害による減少を示さなかった。このことから、ユビキチン化によってユビキチン化非依存的プロテアソーム依存的分解が抑制される機構には、PPM1D のアミノ酸残基 450–501 領域が必要であることが示唆された (図 6L, M)。さらに、PPM1D (396–570) および PPM1D (396–530) はいずれの阻害処理にも反応を示さず、PPM1D の C 末端 35 アミノ酸がユビキチン化非依存的プロテアソーム依存的分解に必須であることが明らかとなった (図 6N–Q)。

以上より、野生型 PPM1D は、N 末端を介したユビキチン化依存的分解と、C 末端 35 アミノ酸を介したユビキチン化非依存的プロテアソーム依存的分解の双方によって制御される。また、アミノ酸 450–501 領域は、ユビキチン化依存的機構を介してユビキチン化非依存的分解経路を抑制する上で必要な領域であることが示唆された。

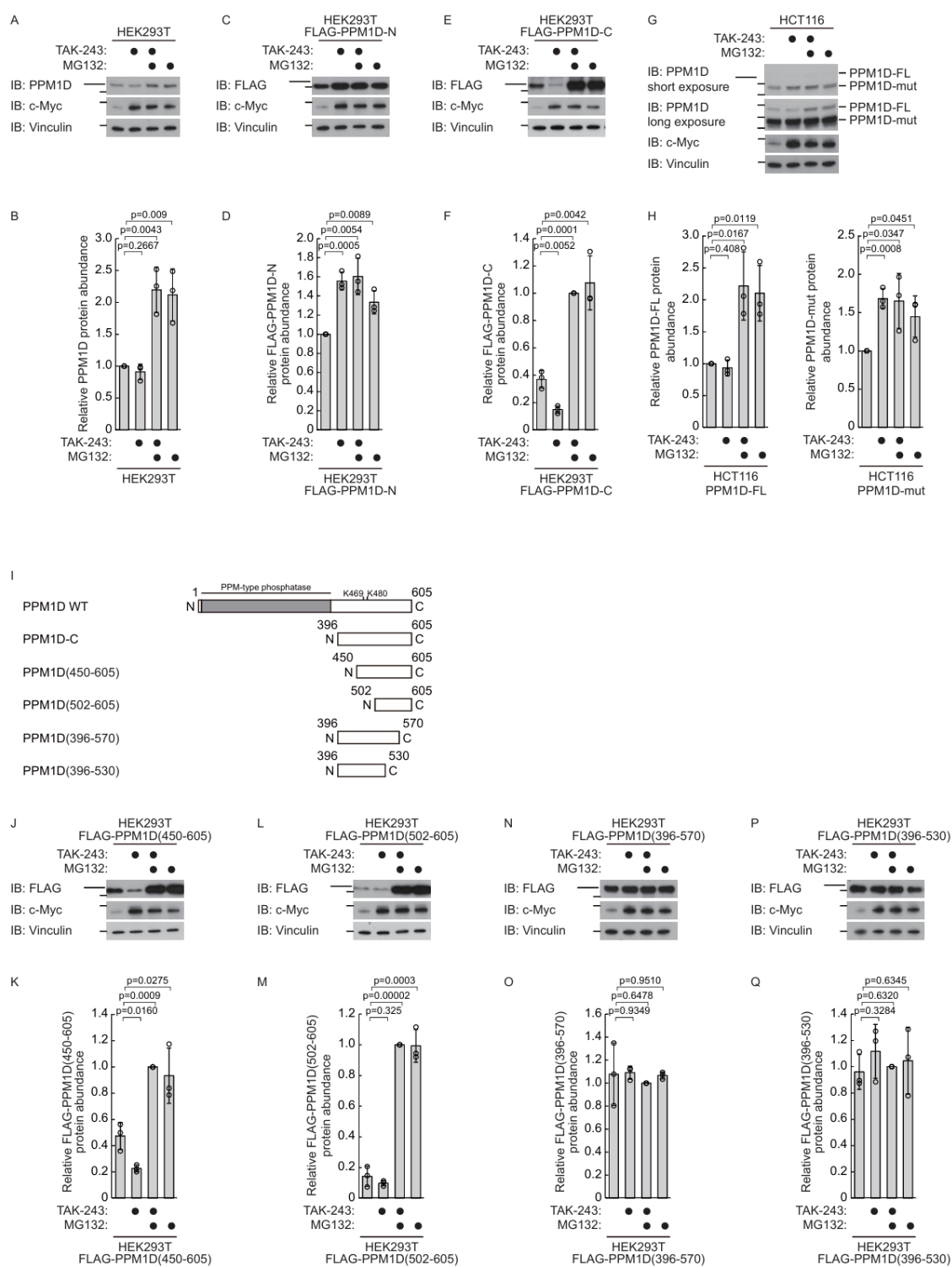


図 6. TAK-243 と MG132 の併用処理により、ユビキチン依存的および非依存的分解の両者の調節に関与する PPM1D の重要な領域の同定
HEK293T または HCT116 細胞を、DMSO を溶媒対照として TAK-243 (250 nM) 単独または MG132 (10 μ M) との併用で 3 時間処理した (n=3)。PPM1D タンパ

ク質量の代表的なウェスタンブロット像 (A, C, E, G, J, L, N, P) および定量結果 (B, D, F, H, K, M, O, Q) を示す。

A, B HEK293T 細胞における内在性 PPM1D。

C–F FLAG-PPM1D-N または FLAG-PPM1D-C を過剰発現する HEK293T 細胞。

G, H PPM1D 全長型 (PPM1D-FL) または変異型 (PPM1D-mut) を発現する HCT116 細胞。

I 本研究で用いた野生型および変異型 PPM1D 断片の模式図。

J–Q 各種 FLAG タグ付き PPM1D 欠失変異体 (450–605, 502–605, 396–570, 396–530) を安定発現する HEK293T 細胞。

タンパク質量は vinculin に対して正規化した。定量データは平均値±標準偏差で示した。

4. PPM1D は 20S プロテアソームによって直接認識・分解される

PPM1D の C 末端領域を介した分解がユビキチン化非依存的であることから、PPM1D が 20S プロテアソームによって直接分解を受ける可能性を検討した。20S プロテアソームは、標的タンパク質の非構造化領域 (intrinsically disordered regions: IDRs) を直接認識してユビキチン化非依存的に分解することが知られている (Ben-Nissan and Sharon, 2014)。そこで、IUPred2A (Mészáros *et al.*, 2018) を用いて PPM1D アミノ酸配列中の IDR を予測したところ、約 500 番目以降の C 末端領域に高い無秩序性がみとめられ、この領域が PPM1D の安定性を規定するデグロンとして機能している可能性が考えられた (図 7A)。20S プロテアソームによるタンパク質のユビキチン化非依存的分解は NAD(P)H:quinone-oxidoreductase-1 (NQO1) によって阻害されることが知られている (Moscovitz *et al.*, 2012)。そこで、20S プロテアソームが PPM1D 分解に果たす役割を検証するため、NQO1 阻害剤であるジクマロールで細胞を処理した。その結果、野生型 PPM1D の発現量はジクマロール処理によって減少した (図 7B)。これは NQO1 阻害が 20S プロテアソーム活性を増強し、PPM1D の直接分解を促進することを示唆しているものと考えられた。

さらに、FLAG-PPM1D-N を過剰発現する HEK293T 細胞をジクマロールで処理したところ、FLAG-PPM1D-N の発現量も低下した (図 8A, B)。この結果は、C 末端を欠損した PPM1D に対しても、20S プロテアソーム活性の上昇が分解を促進しうること示唆している。ただし、図 6C および 6D に示すように、通常条件下では FLAG-PPM1D-N は主にユビキチン依存的に分解される点に留意が必要である。

次に、NQO1 の過剰発現が PPM1D および FLAG-PPM1D-C の安定性に与える影響を検討した。NQO1 を過剰発現する HEK293T 細胞では、野生型 PPM1D、c-Myc、p53（既知の 20S プロテアソーム基質）の発現量に変化は認められなかった（図 8C,D）。この結果は、HEK293T 細胞中の内在性 NQO1 がすでに 20S プロテアソーム活性を十分に抑制していることを示唆する。同様の結果は、FLAG-PPM1D-C を安定発現する HEK293T 細胞においても得られた（図 8E, F）。

さらに *in vitro* にて 20S プロテアソームとリコンビナント PPM1D を混ぜてインキュベートしたところ、PPM1D 量が減少した（図 7C）。以上から、PPM1D は 20S プロテアソームによって直接認識され、ユビキチン非依存に分解されることが示された。

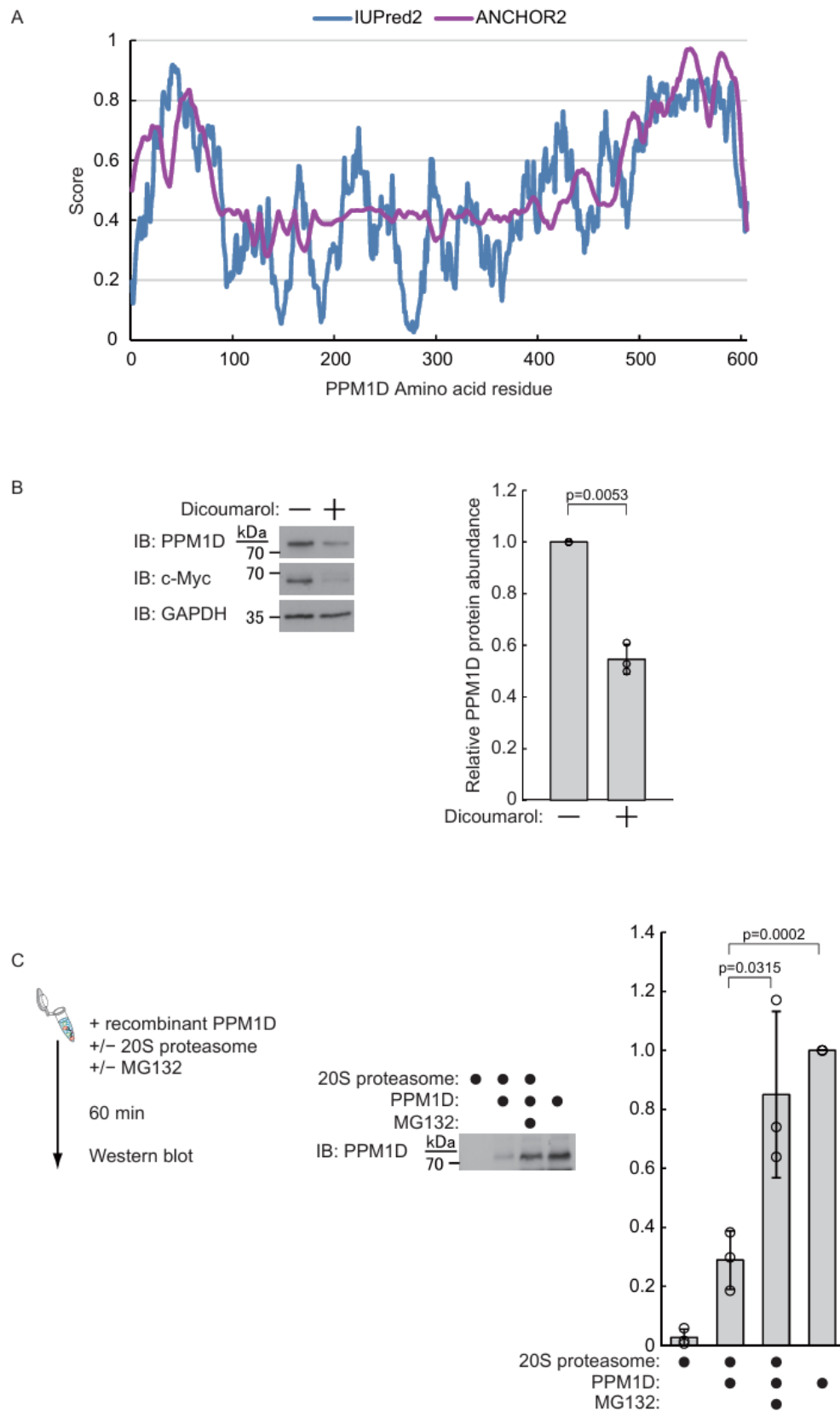


図 7. 20S プロテアソームは PPM1D を直接認識し、ユビキチン非依存的に分解す

る

A PPM1D の IDR を予測するために、2 種類の手法を用いた。青線は IUPred2 による解析結果を、紫線は ANCHOR2 による解析結果を示す。スコアが 0.5 を超える領域は IDR である可能性が高いことを示す。

B HEK293T 細胞をジクマロール (300 μ M) で 3 時間処理した ($n=3$)。PPM1D タンパク質量の代表的なウエスタンブロット像および定量結果を示す。タンパク質量は GAPDH により正規化した。

C 精製した PPM1D および 20S プロテアソームを、MG132 (10 μ M) 存在下または非存在下で 60 分間インキュベートした ($n=3$)。反応液の一部を抗 PPM1D 抗体でウエスタンブロット解析した。タンパク質量は対照群により正規化した。定量データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

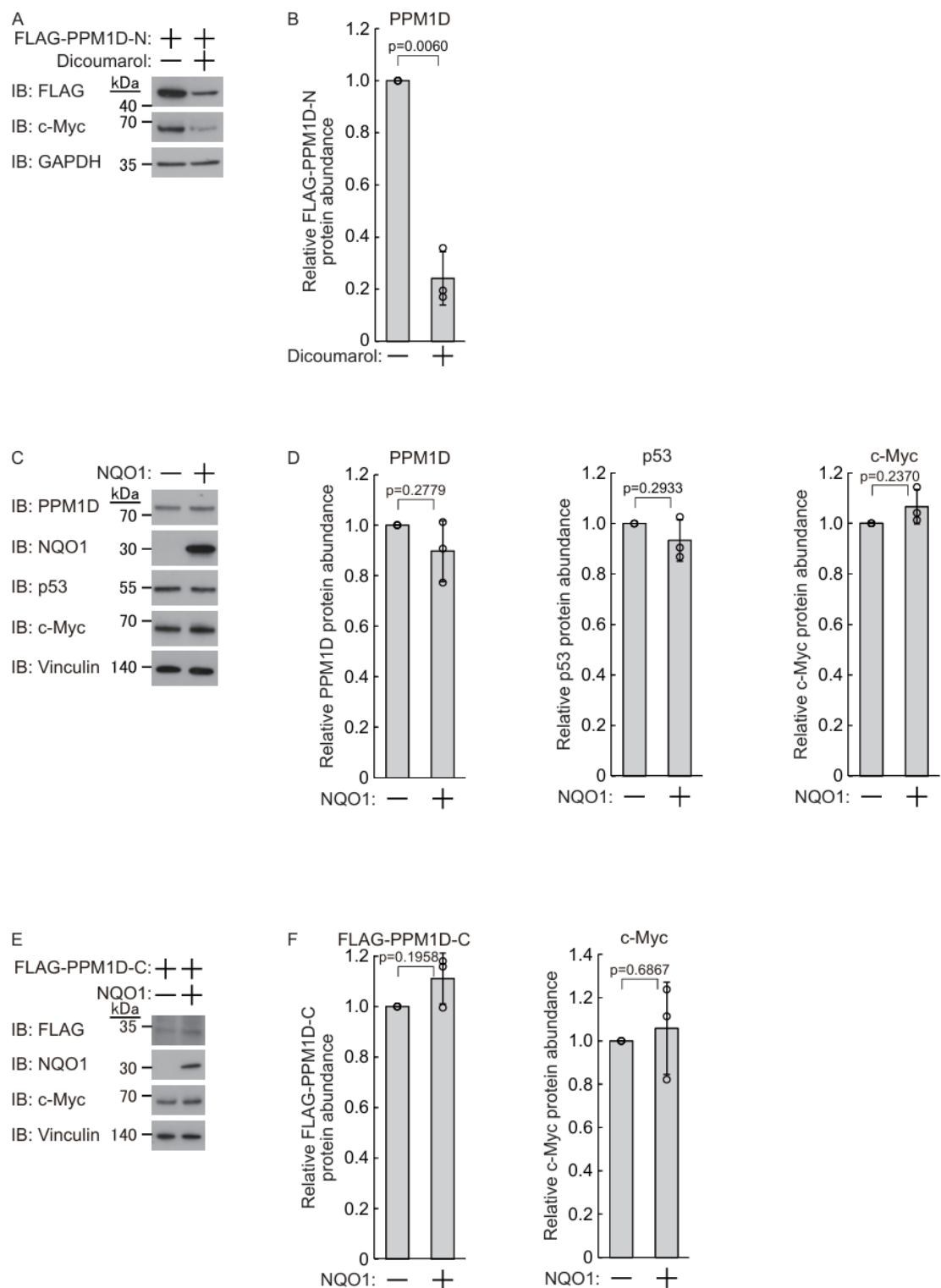


図 8. ジクマロール処理および NQO1 発現が PPM1D タンパク質量に与える影響
 A,B FLAG-PPM1D-N を安定発現する HEK293T 細胞をジクマロール (300 μ M) で 3 時間処理した ($n = 3$)。PPM1D タンパク質量の代表的なウェスタンブロット像 (A) および定量結果 (B) を示す。タンパク質量は GAPDH により正規化

した。

C, D NQO1 を安定発現する HEK293T 細胞および対照細胞における PPM1D タンパク質を解析した。代表的なウエスタンブロット像 (C) および定量結果 (D) を示す。タンパク質量は vinculin により正規化した。

E, F FLAG-PPM1D-C および NQO1 を共発現する、または FLAG-PPM1D-C のみを発現する HEK293T 細胞における PPM1D タンパク質を解析した。代表的なウエスタンブロット像 (E) および定量結果 (F) を示す。タンパク質量は vinculin により正規化した。

定量データは平均値±標準偏差で示した。

5. プロテアソーム活性化因子 PSMD14 および PSME3 は PPM1D の分解を促進する

PPM1D は 20S プロテアソームによって直接認識されて分解を受けることが明らかとなったが、ジクマロール処理時の野生型 PPM1D 量の減少は、50%程度に留まり、これは c-Myc の減少量と比べてゆるやかであった (図 7B)。NQO1 は 26S プロテアソームとは結合しないが、20S プロテアソームとは結合することが報告されていることから、ジクマロールは 20S プロテアソームを介して UbInPD 基質の分解を特異的に誘導する可能性が考えられる (Asher *et al.*, 2005)。一方で、PPM1D の分解には他のプロテアソーム関連調節因子が関与している可能性も想定された。そこで、PPM1D の C 末端領域に結合する分子の同定を試みた。

HEK293T 細胞および FLAG-PPM1D-C を過剰発現させた HEK293T 細胞を MG132 で処理し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を行った (図 9A)。その結果、19S 制御パーティクルのサブユニット PSMD14 およびプロテアソーム活性化因子 PSME3 を FLAG-PPM1D-C 結合分子候補として同定した (図 9B)。質量分析の結果と一致して、イムノブロットにおいても PSMD14 および PSME3 は FLAG-PPM1D-C と共沈降した (図 9C)。

次に、これらの分子が PPM1D の分解に及ぼす影響を検討するため、HEK293T 細胞において PSMD14 および PSME3 のノックダウンを行った。その結果、いずれの分子をノックダウンしても野生型 PPM1D の安定化がみられ、PPM1D の分解抑制が示唆された (図 9D, E)。また先行研究と一致して、PSME3 ノックダウンにより SRC-3 (Li *et al.*, 2006) および p21/CDKN1A (Li *et al.*, 2007) の蓄積が確認された。一方で、PSME3 や PSMD14 の有無にかかわらずユビキチン非依存的にプロテアソームで分解される c-Myc (Murai *et al.*, 2018) および p53 (Asher *et al.*, 2005)

には変化がみられなかった。

さらに、FLAG-PPM1D-C を過剰発現する HEK293T 細胞において同様のノックダウン実験を行ったところ、PSMD14 ノックダウンにより FLAG-PPM1D-C の明確な蓄積がみられたのに対し、PSME3 ノックダウンでは明らかな影響はみられなかった（図 10A, B）。一方、FLAG-PPM1D-N を過剰発現する細胞を用いた実験では、PSMD14 または PSME3 いずれのノックダウンによってもタンパク質量に変化は生じなかった（図 10C, D）。

以上の結果から、PPM1D の C 末端領域の分解は PSMD14 依存的経路を介して促進される一方、PSME3 依存的分解には PPM1D 全長の存在が必要であることが示唆された。

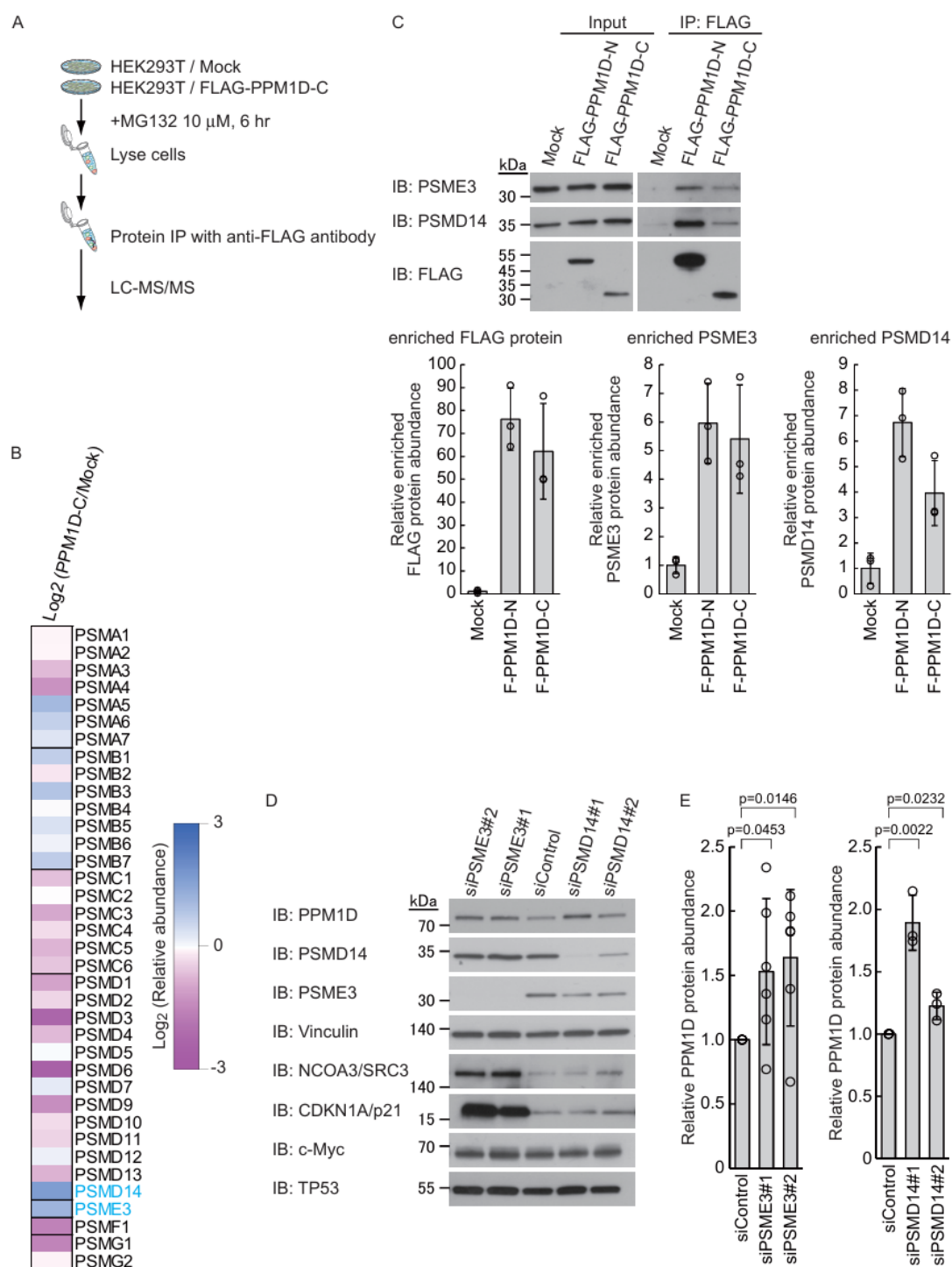


図 9. プロテアソーム活性化因子 PSMD14 および PSME3 は PPM1D のプロテアソーム分解を促進する

A 結合タンパク質同定の実験手順の概略図。HEK293T 細胞において FLAG-PPM1D-C を発現させ、MG132 (10 μ M) で 6 時間処理後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、得られたタンパク質を LC-MS/MS 解析により同定した。得

られたデータはラベルフリー定量法により解析した。

B LC-MS/MS 解析の結果、19S プロテアソーム調節サブユニット PSMD14 およびプロテアソーム活性化因子 PSME3 が FLAG-PPM1D-C と相互作用する候補分子として同定された。PPM1D-C と相互作用するプロテアソーム関連タンパク質を示す。ヒートマップは、対照細胞と比較した各タンパク質の相対的発現量を示す。

C PSMD14 および PSME3 と FLAG-PPM1D-C の細胞内での相互作用を共免疫沈降法により解析した (n=3)。FLAG-PPM1D-C を安定発現する HEK293T 細胞の全細胞溶解液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、得られた免疫沈降物を FLAG、PSMD14、PSME3 抗体でウェスタンブロット解析した。

D, E HEK293T 細胞に PSME3 (n = 6) または PSMD14 (n = 3) を標的とする siRNA を導入した。48 時間後に細胞を回収し、PPM1D、PSME3、PSMD14、NCOA3/SRC3、CDKN1A/p21、c-Myc、p53 各抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。代表的なウェスタンブロット像 (D) および PPM1D タンパク質量の定量結果 (E) を示す。タンパク質量は vinculin で正規化した。定量データは平均値±標準偏差で示した。

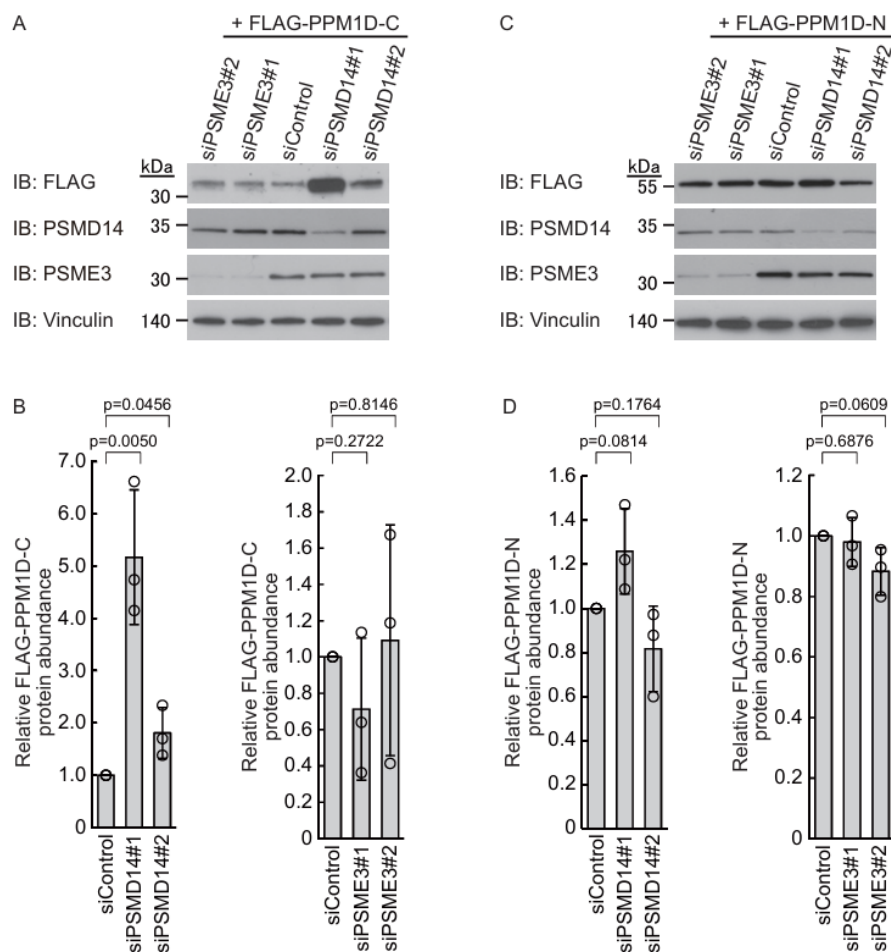


図 10. PSME3 および PSMD14 ノックダウンが PPM1D-N および PPM1D-C 変異体のタンパク質量に及ぼす影響

A–D FLAG-PPM1D-N (A, B) または FLAG-PPM1D-C (C, D) を過剰発現する HEK293T 細胞に、PSME3 (n=3) および PSMD14 (n=3) を標的とする siRNA を導入した。48 時間後に細胞を回収し、FLAG、PSME3、PSMD14、vinculin 各抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。代表的なウェスタンブロット像 (A, C) および PPM1D タンパク質量の定量結果 (B, D) を示す。タンパク質量は vinculin で正規化した。定量データは平均値±標準偏差で示した。

6. プロテアソームと PPM1D の同時阻害は悪性腫瘍の進展を効果的に抑制する

プロテアソーム阻害剤は悪性腫瘍の治療薬として用いられている。PPM1D はがん促進因子として機能する(Deng *et al.*, 2020)ことから、プロテアソーム阻害による PPM1D の蓄積が治療薬としての機能を減弱させる可能性が考えられた。そ

こで、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブと、PPM1D 阻害剤である GSK2830371 の併用が悪性腫瘍の進展を効果的に抑制できると仮説を立て検証した。

まず、p53 野生型を有する U87MG、A549、HCT116、U2OS 細胞を用いて細胞生存アッセイを行った。これまでの結果と同様に、これらの細胞ではボルテゾミブ処理によって PPM1D 量の蓄積がみられた (図 11A, B)。これらの細胞に対し GSK2830371 を併用して細胞死に対する影響を検討したところ、いずれの細胞株においても単剤投与と比較して、細胞増殖抑制効果が有意に増強された (図 11C, D, F, G, I, J, L, M)。

両阻害剤の併用効果を定量的に評価するため、Chou–Talalay 法を用い combination index (CI) 解析を実施した。その結果、Fa 値 0.5 以上の濃度域において全ての細胞株で相乗効果 ($CI < 1$) がみとめられた (図 11E, H, K, N)。すなわち、プロテアソーム阻害剤と PPM1D 阻害剤の併用が単剤療法に比べ抗腫瘍効果を増強することを示唆した。各細胞株における median-effect plot および isobologram は図 12A–H に示した。

次に、この併用効果が腫瘍細胞特異的であるか検討するため、非腫瘍性不死化細胞である hTERT-RPE1 細胞および HEK293 細胞でも同様の実験を行った。hTERT-RPE1 細胞では腫瘍細胞と同等の相乗効果がみられたが (図 13A–E)、HEK293 細胞では $Fa < 0.9$ の範囲では相乗効果はみられず (図 13F–J)、併用効果が細胞種に依存する可能性が示唆された。

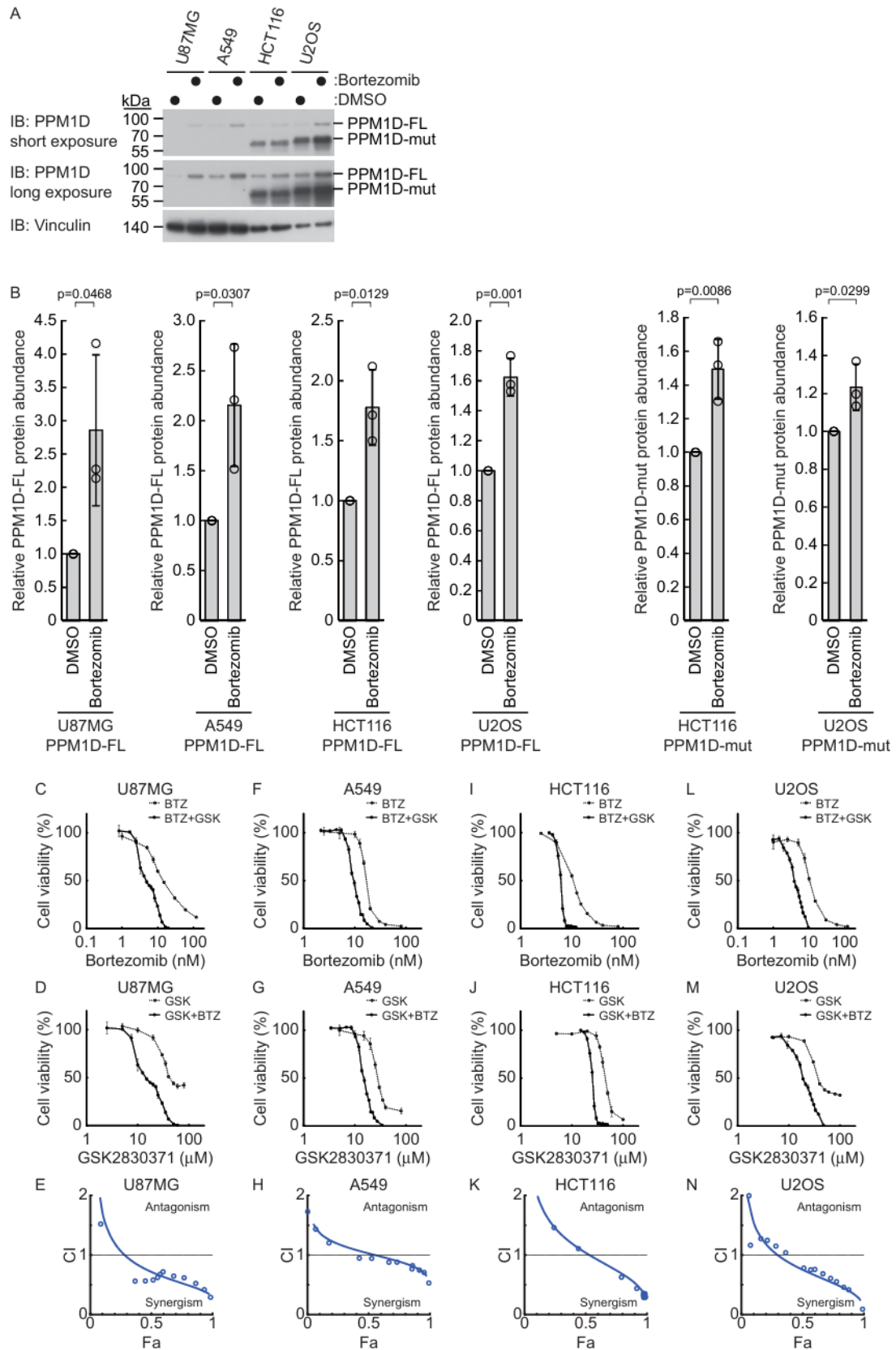


図 11. プロテアソーム阻害剤の腫瘍抑制効果は PPM1D 阻害剤との併用により

増強される

A, B U87MG 細胞 (64 nM)、A549 細胞 (32 nM)、HCT116 細胞 (16 nM)、および U2OS (32 nM) 細胞に対し、溶媒対照として DMSO を用い、ボルテゾミブで 8 時間処理した (n = 3)。PPM1D 変異型 (PPM1D-mut) または全長型 (PPM1D-FL) の代表的なウェスタンブロット像 (A) および定量結果 (B) を示す。各タンパク質量は vinculin で正規化した。

C-N 各細胞に対して、ボルテゾミブ、GSK2830371、または両者の併用を、それぞれの IC₅₀ 値に基づく固定モル比で 48 時間処理した (n = 3)。細胞生存率は Cell Counting Kit-8 アッセイにより評価した。ボルテゾミブ単剤および GSK2830371 併用時の用量反応曲線を C, F, I, L に、GSK2830371 単剤およびボルテゾミブ併用時の曲線を D, G, J, M に示す。データは平均±SD を示す。

E, H, K, N CompuSyn 解析により得られた CI プロットを示す。x 軸は影響を受けた分画 (Fa)、y 軸は CI 値を示す。CI < 1 は相乗効果を示す。

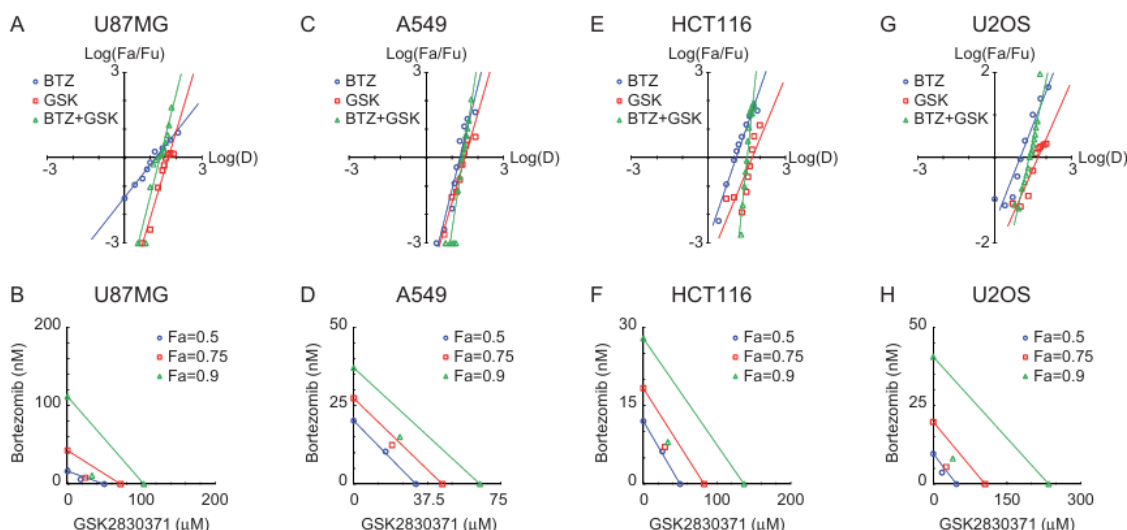


図 12. p53 野生型悪性腫瘍細胞株におけるボルテゾミブと GSK2830371 併用効果の median-effect プロットおよび isobologram

Median-effect プロット (A, C, E, G) および対応する isobologram (B, D, F, H) を、U87MG (A-B)、A549 (C-D)、HCT116 (E-F)、U2OS (G-H) 細胞について、各薬剤の IC₅₀ 値に基づく固定モル比でボルテゾミブと GSK2830371 を併用処理し、Chou-Talalay 法により作成した。

Median-effect プロットは、用量反応データが mass-action law にどの程度適合するかを評価するものである。Fa および Fu はそれぞれ影響を受けた分画および影響を受けなかった分画 (Fu = 1 - Fa) を示し、D は所定の効果を得るために必要な薬剤濃度を示す。

Isobologram は、異なる Fa レベルにおける併用用量を理論的加算線と比較したものであり、データ点が加算線より下に位置する場合、相乗効果が示唆される。

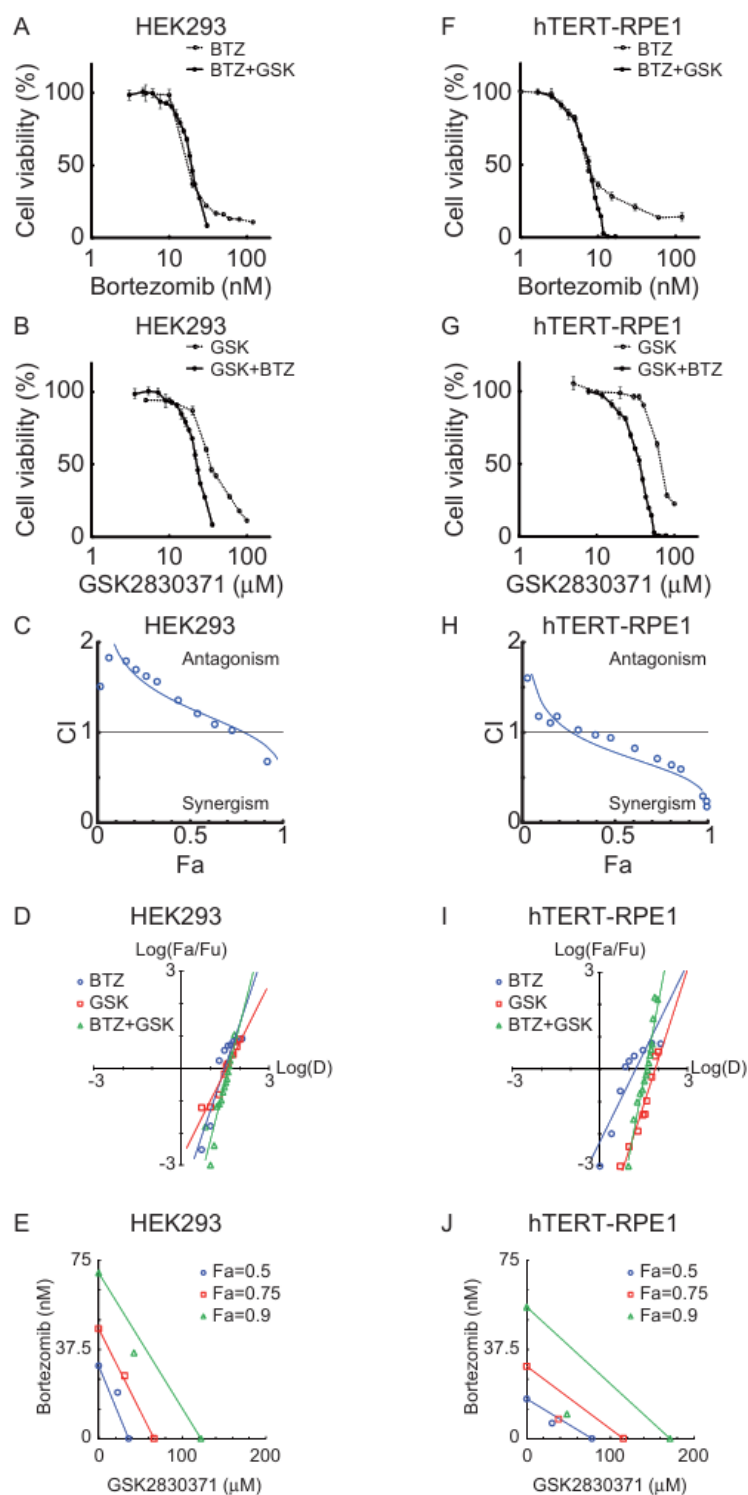


図 13. 非腫瘍性不死化細胞株におけるボルテゾミブと GSK2830371 の併用効果

の評価

HEK293 細胞 (A-E) および hTERT-RPE1 細胞 (F-J) において、各薬剤の IC_{50} 値に基づく固定モル比でボルテゾミブおよび GSK2830371 を種々の濃度で併用処理した。

A, F ボルテゾミブ単剤および GSK2830371 併用時の用量反応曲線。

B, G GSK2830371 単剤およびボルテゾミブ併用時の用量反応曲線。

C, H Chou–Talalay 法に基づく CI プロット。x 軸は Fa、y 軸は CI を示す。CI < 1 は相乗効果を示す。

D, I Median-effect プロット。Fu は影響を受けなかった分画 ($F_u = 1 - F_a$) を示し、D は所定の効果を得るための薬剤濃度を示す。

E, J Isobologram。異なる効果レベルにおける薬剤間の相互作用を示す。CI < 1、またはデータ点が加算線より下に位置する場合、相乗効果があることを示す。

7. プロテアソームおよび PPM1D 阻害は、ボルテゾミブ耐性細胞においても相乗的な効果を示す

ボルテゾミブと GSK2830371 の併用効果が薬剤耐性細胞においても維持されるかを検証するため、U87MG、A549、HCT116、U2OS の各細胞株に対してボルテゾミブを含む培地中で 30 日間連続培養し、ボルテゾミブ耐性株を樹立した。各細胞株における耐性誘導時のボルテゾミブ濃度、および親株と耐性株のボルテゾミブおよび GSK2830371 に対する IC_{50} 値を表 1 に示す。

耐性を獲得した後も、すべての耐性細胞株において親株と同様の傾向が観察された。すなわち、ボルテゾミブと GSK2830371 の併用により、いずれか単剤処理よりも顕著な細胞増殖抑制効果がみとめられた (図 14A, B, D, E, G, H, J, K)。さらに、Chou–Talalay 法を用いた CI 解析の結果、すべての耐性株において Fa 値が 0.5 以上の領域で相乗効果 (CI < 1) が確認された (図 14C, F, I, L)。これらの耐性株に対する median-effect プロットおよび isobologram を図 15A–H に示す。

以上の結果から、プロテアソームと PPM1D の二重阻害は、ボルテゾミブ耐性が生じた腫瘍細胞に対しても有効な治療戦略となり得ることが示唆された。

表 1. 親株およびボルテゾミブ耐性細胞株における IC_{50} 値および耐性状況の概要
U87MG、A549、HCT116、U2OS の親株およびボルテゾミブ耐性株を用いて、ボルテゾミブおよび GSK2830371 に対する感受性を細胞生存アッセイにより評価した。耐性株は、表中に示す濃度のボルテゾミブを含む培地中で段階的に濃度を上げながら継続培養することで樹立した。

	U87MG	A549	HCT116	U2OS
ボルテゾミブ IC ₅₀ (親株、nM)	16.4	20.2	12.0	9.7
GSK2830371 IC ₅₀ (親株、μM)	50.0	31.7	49.9	47.3
耐性誘導時のボルテゾミブ濃度 (nM)	25.0	75.0	50.0	50.0
ボルテゾミブ IC ₅₀ (耐性株、nM)	47.7	145.4	43.1	74.8
ボルテゾミブ IC ₅₀ 倍率 (耐性株／親株)	2.91	7.20	3.59	7.71
GSK2830371 IC ₅₀ (耐性株、μM)	45.2	29.0	45.9	31.5
GSK2830371 IC ₅₀ 倍率 (耐性株／親株)	0.90	0.91	0.92	0.67

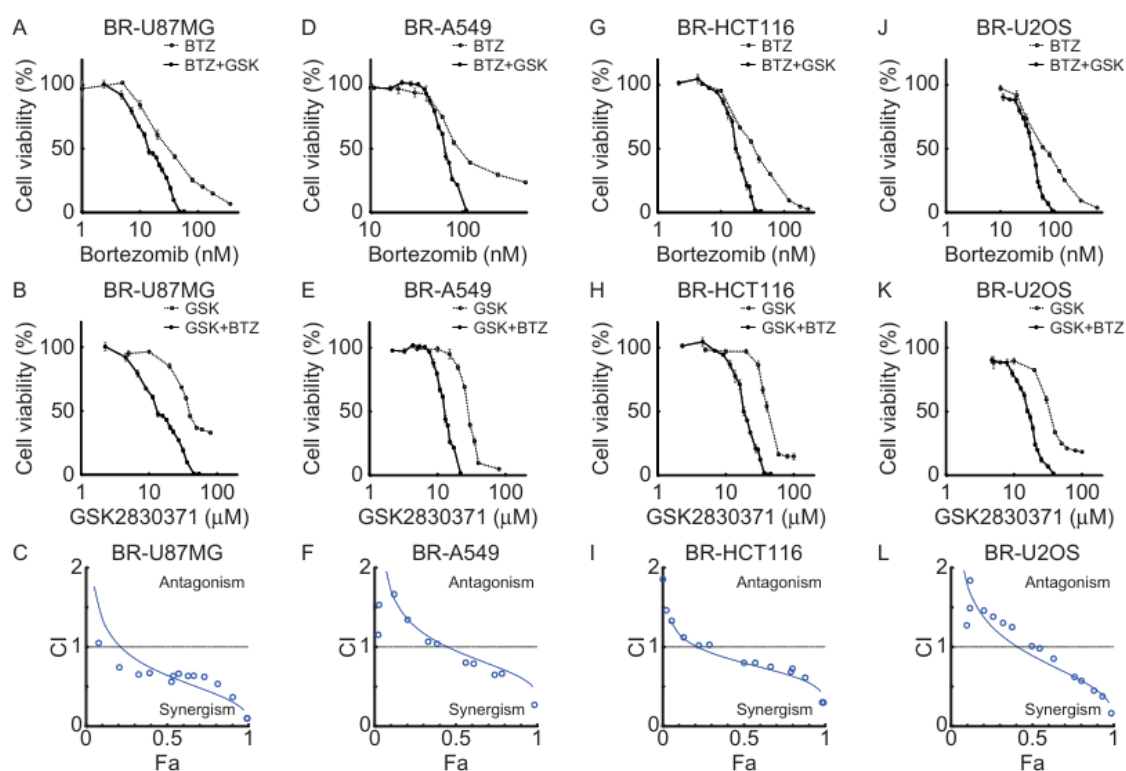


図 14. ボルテゾミブ耐性細胞において、ボルテゾミブと GSK2830371 は相乗的な細胞障害効果を示す

ボルテゾミブ耐性 (BR) 細胞を、各薬剤の IC₅₀ 値に基づく固定モル比で設定したさまざまな濃度のボルテゾミブ、GSK2830371、または両者の併用で 48 時間処理した。細胞生存率は Cell Counting Kit-8 アッセイにより評価した (n = 3)。単剤処理および併用処理の用量反応曲線を A、B、D、E、G、H、J、K パネルに示す。データは平均値 ± SD で示した。CompuSyn 解析によって得られた CI プロットを C、F、I、L パネルに示す。x 軸は影響を受けた分画 (Fa) を、y 軸は CI 値を示す。CI < 1 は、相乗効果があることを示す。

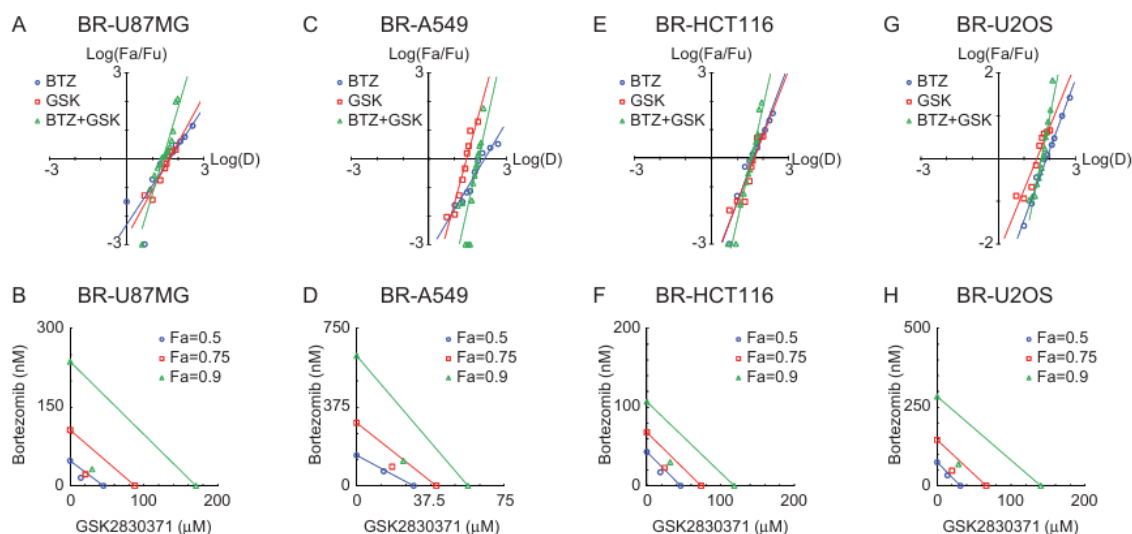


図 15. ボルテゾミブ耐性がん細胞株におけるボルテゾミブおよび GSK2830371 併用処理の median-effect プロットおよび isobologram

ボルテゾミブ耐性 (BR) 株である U87MG (A, B)、A549 (C, D)、HCT116 (E, F)、および U2OS (G, H) 細胞に対し、各耐性株の IC_{50} 値に基づいた固定モル比でボルテゾミブおよび GSK2830371 を種々の濃度で 48 時間処理した。Chou-Talalay 法により median-effect プロット (A, C, E, G) および対応する isobologram (B, D, F, H) を作成した。median-effect プロットは、用量と効果の関係および質量作用の法則への適合性を評価するものである。Fa および Fu は、それぞれ作用を受けた割合および作用を受けなかった割合 ($F_u = 1 - F_a$) を示す。D は、特定の効果を得るために必要な薬剤濃度を表す。isobologram は、異なる Fa レベルにおける薬剤併用量と加成性の基準線からの偏差を示しており、基準線より下方の点は両薬剤間の相乗効果を示す。

考察

本研究では、PPM1D の C 末端に存在する IDR がデグロンとして機能し、20S プロテアソームがこれを直接認識・分解することを明らかにした。さらに、PPM1D のアミノ酸残基 450–501 の領域が、ユビキチン化を介した UbInPD の抑制に必須であることを示した。また、PSMD14 および PSME3 がこの過程を活性化する役割を担う可能性が示唆された (図 16A)。さらに、プロテアソーム阻害によって PPM1D が蓄積することが腫瘍細胞の化学療法耐性に寄与していると仮定し、プロテアソーム阻害剤と PPM1D 阻害剤の併用が抗腫瘍効果を高めることを示した。

HCT116 細胞 (p.L450X) および U2OS 細胞 (p.R458X) は、野生型 PPM1D と C 末端欠損型変異体の両方をヘテロ発現しており、変異型タンパク質は顕著に安定化していた。この安定化は、通常 PPM1D の C 末端を標的とする UbInPD 経路による分解からの逃避によるものであると考えられる。一方で、人工的に導入した変異体 FLAG-PPM1D-N (1–395) の分解速度は、HCT116 細胞および U2OS 細胞内の内在性変異体よりも速かった (図 3E, G)。FLAG-PPM1D-N (1–395) および HCT116 変異体 (p.L450X) のいずれも、主としてユビキチン・プロテアソーム系によって分解されることから (図 6C, D, G, H)、アミノ酸 396–449 の領域がユビキチンリガーゼによる認識を妨げている可能性がある (図 16B, C)。

ユビキチン化による UbInPD の抑制には、2 つの機構が考えられる。1 つは間接的な機構であり、ユビキチン化された他の非 PPM1D タンパク質が、分解装置との競合、あるいは PPM1D の UbInPD を促進する因子のユビキチン依存的分解を介して、PPM1D 分解を妨げるというものである。もう 1 つは直接的な機構であり、PPM1D の 450–501 残基領域のユビキチン化が UbInPD を抑制するというものである。この領域には Lys469 および Lys480 が存在し、これらの部位のユビキチン化が PPM1D の C 末端構造を安定化させ、プロテアソームによる認識や分解処理を阻害する可能性が考えられる (図 16D)。

を有するタンパク質を認識することが知られている(Ben-Nissan and Sharon, 2014; Hwang *et al.*, 2011)。本研究では、NQO1 阻害剤を用いた実験およびリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 解析により、PPM1D が 20S プロテアソームによって直接分解されることを示した。PPM1D の分解機構の一部は、その C 末端に位置する IDR が 20S プロテアソームに直接認識されることに依存していると考えられる。一方で、ジクマロール処理後の野生型 PPM1D の減少は、c-Myc に比べて緩やかであった (図 7B)。この結果から、PPM1D の UbInPD 過程に追加の補助因子が関与している可能性が考えられ、PPM1D C 末端結合タンパク質として PSMD14 および PSME3 を同定した。実際、PSMD14 および PSME3 のノックダウンにより PPM1D が安定化したことから、これらの因子が分解促進に寄与していることが確認された。PSMD14 は 19S プロテアソームのサブユニットであり、PSME3 はプロテアソーム活性化因子である。特に PSME3 は、細胞増殖や細胞周期に関与するタンパク質の分解促進に関わっており(Fesquet *et al.*, 2021)、転写共活性化因子 SRC-3 を 20S プロテアソームにリクルートしてユビキチン非依存的に分解させることが報告されている(Li *et al.*, 2006)。同様に、PSME3 は PPM1D を 20S プロテアソームにリクルートすることでその分解を促進している可能性がある。PPM1D の C 末端には、20S プロテアソームによって直接認識される IDR と、PSMD14 および PSME3 が結合し分解を促進する領域が存在しており、これは HCT116 細胞および U2OS 細胞で C 末端欠損変異体が安定化していた観察結果と一致する。PPM1D 分解を制御するより特異的なデグロンを特定するためには、C 末端 35 残基に含まれる IDR のさらなる解析が必要である。

さらに、本研究結果は、PPM1D が通常、UbInPD によって恒常的に低レベルに維持されており、これにより細胞が多様な刺激に迅速に応答できることを示唆している。たとえば DNA 損傷時には、PPM1D の低い基底レベルが p53 経路の迅速な活性化を可能にし、細胞周期停止および DNA 修復プログラムの誘導を促す。一方、ユビキチン依存的分解は、より緩徐かつ精密な調節を要する状況、すなわち応答終結過程における段階的な PPM1D 量の制御などに適している。DNA 損傷が修復可能であると判断される場合、ユビキチン非依存的プロテアソーム経路の抑制により PPM1D が安定化し、p53 活性が段階的に減弱して細胞周期再進行が可能となる。逆に、損傷が重度で修復不可能な場合には、ユビキチン依存的プロテアソーム経路が活性化され、PPM1D が低レベルに維持されることで p53 活性が持続し、アポトーシスなどの不可逆的な細胞運命決定が促される。このように、2 つの分解機構の共存は、刺激の性質や強度、損傷の修復可能性に応じて PPM1D の分解速度と様式を調節し、p53 活性を精密に制御して適切な細胞運命を決定する役割を果たしている可能性がある。

近年、標的タンパク質分解は疾患関連タンパク質の除去を目的とした創薬分野で注目を集めている。その中でも、最も確立された技術の一つである PROTAC (PROteolysis TArgeting Chimera) は、標的タンパク質をユビキチンリガーゼに近接させ、ユビキチン依存的プロテアソーム分解を誘導する(Békés *et al.*, 2022)。しかし、PROTAC に利用可能なユビキチンリガーゼの種類は依然として限られており、適用拡大に向けた研究が進められている。その中で、標的タンパク質を小分子によって直接プロテアソームヘリクルートする手法が、ユビキチン非依存的分解を利用した代替的アプローチとして注目されている。19S プロテアソームのサブユニット PSMD2 に結合するリガンドが同定され、このリガンドと BRD4 結合性リガンドをリンカーで連結した二官能性分子が、BRD4 を UbInPD 経路に誘導することが報告されている(Bashore *et al.*, 2023)。さらに、HaloTag リガンドとブロモドメインリガンドからなる二官能性分子を用いて、HaloTag をプロテアソームサブユニット RPN13 に融合することで、BRD2 の UbInPD が誘導されることが示された(Balzarini *et al.*, 2023)。この分子は BRD2 のパラログである BRD4 にも結合可能であったが、その分解は誘導できなかったことから、UbInPD の成立には特定の構造的条件が必要であることが示唆された。重要な要因の一つとして、標的タンパク質がプロテアソームにリクルートされた際の立体的配置が挙げられる。したがって、内在性 UbInPD 基質とそれぞれのプロテアソーム受容体との関係を理解することが、有効な小分子分解誘導薬の設計において重要となる。本研究では、PSMD14 および PSME3 が PPM1D 分解を促進することを明らかにした。これらの分子はプロテアソーム分解促進因子としての役割を持つことから、UbInPD 誘導を目的とした将来の創薬標的となる可能性がある。

PPM1D 阻害剤に関する既報では、マン托ル細胞リンパ腫において p53 活性化およびアポトーシス誘導が主要な抗腫瘍機構であることが示されている(Kojima *et al.*, 2016)。また、PPM1D の阻害は乳がん細胞において遺伝毒性ストレスへの感受性を高め、細胞周期遅延、G2 チェックポイント活性化、および p53 経路活性化を介してアポトーシスを促進することが報告されている(Pechackova *et al.*, 2016)。これらの知見に基づき、PPM1D 阻害剤は悪性腫瘍に対する有望な治療薬候補として注目されている(Pecháčková *et al.*, 2017)。本研究ではさらに、プロテアソーム阻害による PPM1D の蓄積が、C 末端欠損変異体で観察される悪性化と同様に腫瘍細胞の生存に寄与している可能性を検討した。A549、U87MG、HCT116、U2OS 細胞では、ボルテゾミブ処理により PPM1D タンパク質量が増加し、ボルテゾミブと PPM1D 阻害剤 GSK2830371 の併用は細胞増殖を相乗的に抑制した。Chou–Talalay 法を用いた解析の結果、すべての細胞株において PPM1D

阻害剤との併用がボルテゾミブの抗増殖効果を相乗的に高めることが確認された。特に、高い効果量において相乗効果がより顕著であり、プロテアソームと PPM1D の同時阻害が強い増殖圧下で特に有効であることを示唆している。これらの結果から、少なくとも野生型 p53 を有する細胞においては、プロテアソームと PPM1D の併用阻害が腫瘍進行を効果的に抑制する可能性が示された。しかし、一部の非腫瘍性細胞でも相乗効果がみられたことから、この戦略が悪性細胞のみならず正常細胞にも影響を及ぼす可能性があり、治療選択性に関する限界および安全性・特異性のさらなる検討が必要である。このような解決すべき課題があるものの、本研究の知見は、プロテアソームおよび PPM1D の同時阻害を新たな癌治療戦略として追究する強い根拠を提供するものである。

結論

1. 本研究全体から得られた新知見

- ・プロテアソームによる PPM1D 分解には複数の経路が存在し、ユビキチン化が関与する複雑な制御を受けている
- ・PPM1D は主として UbInPD 経路により分解され、この経路では C 末端の非構造化領域がプロテアソームによる認識標的となる。
- ・PPM1D C 末端における UbInPD は、プロテアソーム調節因子 PSMD14 および PSME3 により促進される。
- ・アミノ酸残基 450–501 領域のユビキチン化は、PPM1D C 末端を標的とした UbInPD を抑制している可能性がある。
- ・PPM1D N 末端はユビキチン化依存的プロテアソーム分解を受ける。
- ・アミノ酸 396–449 領域が、PPM1D N 末端を標的とするユビキチンリガーゼによる認識を阻害している可能性がある。
- ・PPM1D 阻害剤とプロテアソーム阻害剤の併用は抗腫瘍効果を相乗的に増強し、ボルテゾミブ耐性株においても有効である。

2. 新知見の意義

本研究は、PPM1D の分解機構を分子レベルで明らかにし、PPM1D 変異を有する細胞がどのようにプロテアソーム分解から逃避しているかを解明した。特に、PPM1D がユビキチン化非依存的にプロテアソームにより分解される一方で、その分解がユビキチン化依存的に抑制されるという、従来にない制御モデルを提示した点は重要である。これらの発見は、他のタンパク質分解制御機構の理解にも応用可能な新たな理論的枠組みを提供する。また、腫瘍細胞の悪性化メカニズムの理解を進展させるとともに、PPM1D が新たな抗腫瘍治療標的となり得ることを示唆した。さらに、PPM1D 阻害剤とプロテアソーム阻害剤の併用による抗腫瘍効果の相乗増強は、新規治療法開発への重要な足掛かりとなる。

3. 今後の研究展開と課題

UbInPD 経路を介した PPM1D 分解が、他の細胞ストレス応答経路とどのように連携しているかは未解明である。今後は、系統的なプロテオーム解析を通じて、分解制御ネットワークを包括的に理解する必要がある。また、PPM1D 阻害剤とプロテアソーム阻害剤の併用療法については、現時点では細胞レベルでの解析

にとどまっております、**in vivo** モデルを用いた検証が今後の課題となる。

謝辞

本研究の遂行および学位論文を作成するにあたり、多くの方々のご指導とご支援を賜りました。

北海道大学大学院医学研究院生理系部門生化学分野医化学教室 教授 畠山鎮次先生、講師 渡部昌先生には、研究の着想から実験手法、論文執筆まで全面的なご指導を賜りました。ここに深くお礼申し上げます。

また、医化学教室の講師 近藤豪先生、技術補助員 坂田紫帆氏、秘書 松崎由美氏、吉田周世氏、北海道大学大学院医学研究院病態制御学専攻感覚器病学分野耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室の助教 中藺彬先生、特任助教 木村将吾先生、北海道大学大学院医学研究院侵襲制御医学分野救急医学教室の教授 和田剛志先生にも研究に関するご支援を賜りましたことを重ねてお礼申し上げます。

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費助成事業（24H01877：畠山鎮次、19K22408、21H02690、24K02235：渡部昌）、公益財団法人 細胞科学研究財団（渡部昌）、公益財団法人 武田科学振興財団（渡部昌）、公益財団法人 日立財団 倉田奨励金（渡部昌）による助成により遂行されました。

利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反はない。

引用文献

- Asher G, Tsvetkov P, Kahana C and Shaul Y (2005) A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev.* 19, 316-321.
- Balzarini M, Gui W, Jayalath IM, Schell BB, Tong J and Kodadek T (2023) Recruitment to the Proteasome Is Necessary but Not Sufficient for Chemically Induced, Ubiquitin-Independent Degradation of Native Proteins. *ACS Chem Biol.* 19, 2323-2335.
- Bashore C, Prakash S, Johnson MC, Conrad RJ, Kekessie IA, Scales SJ, Ishisoko N, Kleinheinz T, Liu PS, Popovych N, et al (2023) Targeted degradation via direct 26S proteasome recruitment. *Nat Chem Biol.* 19, 55-63.
- Baugh JM, Viktorova EG and Pilipenko EV (2009) Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol.* 386, 814-827.
- Békés M, Langley D and Crews C (2022) PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat Rev Drug Discov.* 21, 181-200.
- Ben-Nissan G and Sharon M (2014) Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules.* 4, 862-884.
- Burocziova M, Danek P, Oravetzova A, Chalupova Z, Alberich-Jorda M and Macurek L (2023) Ppm1d truncating mutations promote the development of genotoxic stress-induced AML. *Leukemia.* 37, 2209-2220.
- Chen X, Chi Y, Bloecher A, Aebersold R, Clurman BE and Roberts JM (2004) N-acetylation and ubiquitin-independent proteasomal degradation of p21(Cip1). *Mol Cell.* 16, 839-847.
- Choi DW, Na W, Kabir MH, Yi E, Kwon S, Yeom J, Ahn JW, Choi HH, Lee Y, Seo KW, et al (2013) WIP1, a homeostatic regulator of the DNA damage response, is targeted by HIPK2 for phosphorylation and degradation. *Mol Cell.* 51, 374-385.
- Chou T and Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 22, 27-55.

Deng W, Li J, Dorrah K, Jimenez-Tapia D, Arriaga B, Hao Q, Cao W, Gao Z, Vadgama J and Wu Y (2020) The role of PPM1D in cancer and advances in studies of its inhibitors. *Biomed Pharmacother.* 125, 109956.

Fesquet D, Llères D, Grimaud C, Viganò C, Méchali F, Boulon S, Coux O, Bonne-Andrea C and Baldin V (2021) The 20S proteasome activator PA28 γ controls the compaction of chromatin. *J Cell Sci.* 134, jcs257717.

Fiscella M, Zhang H, Fan S, Sakaguchi K, Shen S, Mercer WE, Vande Woude GF, O'Connor PM and Appella E (1997) Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 6048-6053.

Gilmartin AG, Faitg TH, Richter M, Groy A, Seefeld MA, Darcy MG, Peng X, Federowicz K, Yang J, Zhang SY, et al (2014) Allosteric Wip1 phosphatase inhibition through flap-subdomain interaction. *Nat Chem Biol.* 10, 181-187.

Gu X, Nardone C, Kamitaki N, Mao A, Elledge SJ and Greenberg ME (2023) The midnolin-proteasome pathway catches proteins for ubiquitination-independent degradation. *Science.* 381, eadh5021.

Hwang J, Winkler L and Kalejta RF (2011) Ubiquitin-independent proteasomal degradation during oncogenic viral infections. *Biochim Biophys Acta.* 1816, 147-157.

Itakura E, Zavodszky E, Shao S, Wohlever ML, Keenan RJ and Hegde RS (2016) Ubiquilins chaperone and triage mitochondrial membrane proteins for degradation. *Mol Cell.* 63, 21-33.

Jariel-Encontre I, Bossis G and Piechaczyk M (2008) Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta.* 1786, 153-177.

Khadka P, Reitman ZJ, Lu S, Buchan G, Gionet G, Dubois F, Carvalho DM, Shih J, Zhang S, Greenwald NF, et al (2022) PPM1D mutations are oncogenic drivers of de novo diffuse midline glioma formation. *Nat Commun.* 13, 604.

Kisselev AF, Kaganovich D and Goldberg AL (2002) Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings. *J Biol Chem.* 277, 22260-22270.

Kleiblova P, Shaltiel IA, Benada J, Ševčík J, Pecháčková S, Pohlreich P, Voest EE, Dunder P, Bartek J, Kleibl Z, et al (2013) Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint. *J Cell Biol.* 201, 511-521.

Kojima K, Maeda A, Yoshimura M, Nishida Y and Kimura S (2016) The pathophysiological significance of PPM1D and therapeutic targeting of PPM1D-mediated signaling by GSK2830371 in mantle cell lymphoma. *Oncotarget.* 7, 69625-69637.

Lee JS, Park JR, Kwon OS, Kim H, Fornace AJ Jr and Cha HJ (2014) Off-target response of a Wip1 chemical inhibitor in skin keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 73, 125-134.

Li T, Hogenhout SA and Huang W (2024) Ubiquitin-independent degradation: An emerging PROTAC approach? *Bioessays.* 47, e202400161.

Li X, Amazit L, Long W, Lonard DM, Monaco JJ and O'Malley BW (2007) Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway. *Mol Cell.* 26, 831-842.

Li X, Lonard DM, Jung SY, Malovannaya A, Feng Q, Qin J, Tsai SY, Tsai MJ and O'Malley BW (2006) The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome. *Cell.* 124, 381-392.

Liu J, Zhao RH, Jiang X, Li Z and Zhang B (2021) Progress on the application of bortezomib and bortezomib-based nanoformulations. *Biomolecules.* 12, 51.

Lü S and Wang J (2013) The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomark Res.* 1, 13.

Makarov Y, Raiff A, Timms RT, Wagh AR, Gueta MI, Bekturova A, Guez-Haddad J, Brodsky S, Opatowsky Y, Glickman MH, et al (2023) Ubiquitin-independent proteasomal degradation driven by C-degron pathways. *Mol Cell.* 83, 1921-1935.e7.

Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW and Kimmelman AC (2014) Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature.* 509, 105-109.

Mészáros B, Erdos G and Dosztányi Z (2018) IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Res.*

46, W329-W337.

Moscovitz O, Tsvetkov P, Hazan N, Michaelievski I, Keisar H, Ben-Nissan G, Shaul Y and Sharon M (2012) A mutually inhibitory feedback loop between the 20S proteasome and its regulator, NQO1. *Mol Cell.* 47, 76-86.

Mujtaba T and Dou QP (2011) Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib. *Discov Med.* 12, 471-480.

Murai N, Murakami Y, Tajima A and Matsufuji S (2018) Novel ubiquitin-independent nucleolar c-Myc degradation pathway mediated by antizyme 2. *Sci Rep.* 8, 3005.

Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K and Ichihara A (1992) Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature.* 360, 597-599.

Pechackova S, Burdova K, Benada J, Kleiblova P, Jenikova G and Macurek L (2016) Inhibition of WIP1 phosphatase sensitizes breast cancer cells to genotoxic stress and to MDM2 antagonist nutlin-3. *Oncotarget.* 7, 14458-14475.

Pecháčková S, Burdová K and Macurek L (2017) WIP1 phosphatase as pharmacological target in cancer therapy. *J Mol Med.* 95, 589-599.

Salghetti SE, Kim SY and Tansey WP (1999) Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J.* 18, 717-726.

Sondka Z, Bamford S, Cole CG, Ward SA, Dunham I. and Forbes SA (2018) The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nat Rev Cancer.* 18, 696-705.

Yagi H, Chuman Y, Kozakai Y, Imagawa T, Takahashi Y, Yoshimura F, Tanino K and Sakaguchi K (2012) A small molecule inhibitor of p53-inducible protein phosphatase PPM1D. *Bioorg Med Chem Lett.* 22, 729-732.