



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_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 高橋 正樹

学 位 論 文 題 名

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)

【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、FLAG-PPM1D-C ではユビキチン化阻害により UbInPD が代償的に亢進することを示唆した。

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 細胞におけるノ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。