

令和元年6月11日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01810

研究課題名(和文) プロテインホスファターゼPPM1を標的としたケミカルバイオロジー研究

研究課題名(英文) Chemical biological studies

研究代表者

大西 素子(OHNISHI, Motoko)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：00312653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の金属イオン依存性プロテインSer/Thrホスファターゼ(PPM)は、少なくとも17種類存在し、多様な細胞内シグナル伝達系の制御を担っているが、そのほとんどには有効な阻害物質が無い。本研究では低分子化合物によるPPMホスファターゼの制御を目指し、これまでに見出したPPM1AとPPM1Bに対する複数の活性化物質についてドッキングスタディを行い、PPM1AおよびPPM1Bに対する結合部位を解析し、破骨細胞分化と脂肪細胞に対する作用を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PPM1AおよびPPM1Bの活性化物質としてこれまでに同定されたglabridinとpisiferdiolが、細胞におけるこれらの酵素の生理機能を解明する上で、分子プローブとして有効であることが示された。また本研究により、これらの化合物によってPPM1AやPPM1Bの活性を制御することが、骨粗鬆症、肥満、糖尿病などの疾患の治療や予防に有効である可能性が示されたため、これらの酵素を標的とした薬剤や食品機能性成分の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Metal-dependent protein phosphatases (PPMs) are Mg²⁺/Mn²⁺-dependent enzymes that specifically phosphorylate Ser and Thr residues, and at least 17 different PPM genes are present in the mammalian genome. Although they are central players in disease pathogenesis, only a few inhibitors of PPM phosphatases have been reported and more potent and selective small molecules regulating these enzymes are expected to be developed. In this study, the docking simulation was performed for several small molecules identified as activators of PPM1A and PPM1B to elucidate their binding sites within these phosphatases. Furthermore, we investigated the effects of these compounds on osteoclast differentiation among RAW264 cells and lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：プロテインホスファターゼ 天然低分子物質 生理活性物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテイン Ser/Thr ホスファターゼは、PP1、PP2A および PP2B などを含む phosphoprotein phosphatase (PPP) ファミリーと、Metal-dependent protein phosphatase (PPM) ファミリーの 2 種類に分類される。PPM は大腸菌からヒトに至るまで広く保存され、生物の生命活動に必要不可欠な分子であると考えられており、ほ乳類には 17 種類の異なる遺伝子にコードされるアイソフォームが存在している。

私達は破骨細胞分化因子(RANKL)とその受容体である RANK によって誘導される RANKL/RANK 細胞内シグナル伝達経路におけるプロテインホスファターゼの作用について解析を行い、PPM1B が骨吸収を担う破骨細胞の分化制御に関与していることを明らかにしてきた。その一方、PPM の様々なアイソフォームの発現および精製条件を検討し、得られた組換えタンパク質を用いて、 α -カゼインを基質とした *in vitro* PPM 活性測定システムを構築した。このアッセイ系を用いて PPM1 の活性調節物質を広く探索した結果、これまでに PPM1A および PPM1B を活性化する天然低分子化合物として pisiferdiol と glabridin を見出した。さらに破骨細胞分化におけるこれらの PPM 活性化物質の作用を解析した結果、RANKL によって活性化されるストレス活性化キナーゼ(SAPK)シグナル伝達経路および NF- κ B 経路をともに負に制御することにより、破骨細胞分化を抑制することを明らかにした。この結果から PPM 活性化物質は RANKL/RANK シグナル伝達系のより上流に作用すると考えられた。

一方、従来より様々な研究により PPM1A や PPM1B はグリコーゲン合成酵素 (GS) の活性化や AMP 活性化キナーゼ (AMPK) の不活性化などを介して、エネルギー代謝の制御に関わっていることが示唆されていたが、エネルギー代謝における PP2C の生理機能の詳細は未だ明らかでは無い。また glabridin は、糖尿病のモデルマウスにおいて血糖値降下作用を、肥満モデルマウスにおいて体重低下効果を示すことが報告されているが、その作用機構は明らかでは無い。

そこで破骨細胞分化における PPM 活性化物質の作用機序を明らかにするとともに、エネルギー代謝における PPM 活性化物質の影響を解析し、これらの物質の作用機構の解明を目指した。また活性化物質とともに阻害物質による PPM の制御を目指し、阻害物質の探索を試みた。

2. 研究の目的

(1) PPM1A または PPM1B と PPM 活性化物質の *in silico* ドッキングスタディを行い、予想される結合部位を決定にする。

(2) RANKL/RANK シグナル伝達系における TAK1 に対する PPM 活性化物質の作用を明らかにし、PPM1B が標的であることを検証する。

(3) 脂肪細胞分化における pisiferdiol および glabridin の作用を明らかにする。

(4) これまでに同定した PPM 阻害物質の構造をもとに、より効果的な PPM 阻害物質を探索する。

3. 研究の方法

(1) ドッキングスタディによる活性化物質の PPM ホスファターゼ結合部位の解析

計算には PPM1A および PPM1B の X 線構造解析による結晶構造の PDB ファイル (PDB-ID:1A6Q および PDB-ID:2P8E) を用いた。先に PPM1A および PPM1B 活性化物質として同定した glabridin および pisiferdiol の三次元構造は、CS Chem3D Pro5.0 software(CambridgeSoft Corp.,MA, USA)で三次元表示させ、ハミルトニアンとして AM1 を採用した半経験分子軌道法に基づき最適化した。ドッキング計算は Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD) (Molegro Bioinformatics Solutions) を使用し、PPM1A および PPM1B の N 末端を含む直径 50 Å の球空間を設定して、10,000 回のシミュレーションを実行した。得られた解析結果のうち、Total energy が小さい順に上位 10 回分の結果を採用し、1 回の結果毎にエネルギー値が小さい順に 10 アミノ酸を抽出し、エネルギー値の合算値と抽出回数から、化合物との相互作用に関わるアミノ酸を予測した。

(2) 破骨細胞分化シグナルにおける PPM ホスファターゼ活性化物質の作用解明

これまでの研究から PPM1B は MAP キナーゼキナーゼキナーゼの TGF- β 活性化キナーゼ (TAK1) を脱リン酸化し、不活性化することによって RANKL 下流のシグナル伝達系を抑制することがわかっている。そこで可溶性 RANKL (sRANKL) 存在下で培養すると、多核の巨大な破骨細胞様細胞に分化するマウスマクロファージ由来細胞株 RAW264 細胞を用いて、Westernblot 法により TAK1 のリン酸化レベルに対する PPM 活性化物質の作用を明らかにした。また PPM1B siRNA を用いてその標的が PPM1B であることを検証した。

(3) 成熟脂肪細胞における PPM ホスファターゼ活性化物質の脂肪蓄積抑制効果

マウス繊維芽細胞株 3T3-L1 細胞は、isobutyl-methylxanthine (IBMX), dexamethasone (DEX), insulin によって効率良く脂肪細胞に分化することが知られている。そこで 3T3-L1 細胞を用いて以下を明らかにするために検討を行った。

成熟脂肪細胞の脂肪滴蓄積に対する pisiferdiol と glabridin の効果

3T3-L1 細胞は 24 well plate に播種後、insulin、IBMX、DEX を添加して分化を誘導した。次に成熟脂肪細胞を得るまで insulin のみを含む培地で 4 日間培養後、PPM 活性化物質を加えてさらに 4 日間培養した後、Oil red O を加えて脂肪滴を染色後、Oil red O を抽出、比色定量

を行った。

脂肪細胞分化に対する pisiferdiol と glabridin の効果

3T3-L1 細胞を 96 well プレートに播種して 3 日間培養後、insulin と PPM 活性化物質を加えて培地交換しながら 6 日間培養した。Oil red O による染色と比色定量によって、脂肪細胞分化に対する PPM 活性化物質の影響を検討した。ポジティブコントロールとして 選択的 PPAR のリガンドとして知られる rosiglitazone (1 μM) を用いた。

AMP 活性化キナーゼ (AMPK) に対する pisiferdiol と glabridin の作用

3T3-L1 細胞を insulin で刺激すると、AMPK がリン酸化されて活性化する。また AMPK は脂質合成を負に制御することが知られている。そこでこの AMPK の活性化に対する PPM 活性化物質の作用を調べるため、AMPK のリン酸化 Thr172 に対する抗体を用いて、Western 法によってリン酸化レベルを検討した。さらに AMPK の Thr172 を含むリン酸化ペプチドを基質とした時の PPM1B のホスファターゼ活性に対する glabridin の作用を、マラカイトグリーンを用いたリン酸定量法により検討した。

(4) PPM1D 阻害物質の探索

これまでに PPM1D の特異的阻害剤として見出したジフェニルジセレニドやビス(3-ニトロフェニル)ジスルフィドの構造をもとに、より幅広く PPM ファミリーのプロテインホスファターゼの活性を阻害する化合物を探索するため、ジフェニルジセレニド 1 (R = H) を基本骨格とする種々のジアリールジセレニド 1 (図 1) を合成した。得られた有機セレン化合物について -カゼインを基質としてマラカイトグリーンを用いたリン酸定量法によ

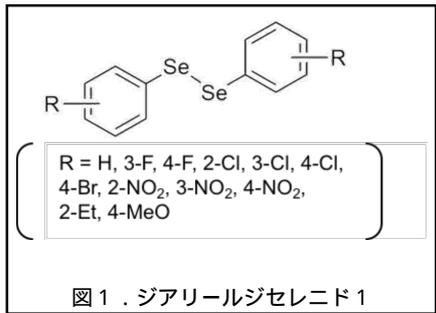


図 1 . ジアリールジセレニド 1

り、His-hPPM1DAC に対する阻害効果を調査した。

4 . 研究成果

(1) ドッキングスタディによる活性化物質の PPM ホスファターゼ結合部位の解析

ドッキングシミュレーションを行い、エネルギー値の合算値が小さくより強い結合が予測される順に 10 アミノ酸残基を抽出した結果、glabridin と PPM1A の相互作用に寄与する可能性が最も高い 3 つのアミノ酸残基は

Arg124、Phe200 および Asp123 であり、いずれも採用された 10 回のシミュレーションのすべての回で抽出されていた。これら 3 つのアミノ酸残基は PPM1A の立体構造において近接しているため、PPM1A における glabridin の結合部位を形成する可能性が高いと考えられた(図 2 A)。pisiferdiol との結合においても相互作用する可能性が最も高い 3 アミノ酸は同じ結果となり、2 つの化合物は PPM1A の共通した部位に結合することが予想された。同様に PPM1B に対する結合部位を予測した結果、2 つの化合物に共通して Arg33、Glu37、His62 の 3 残基が相互作用に強く寄与することが予想された(図 2 B)。

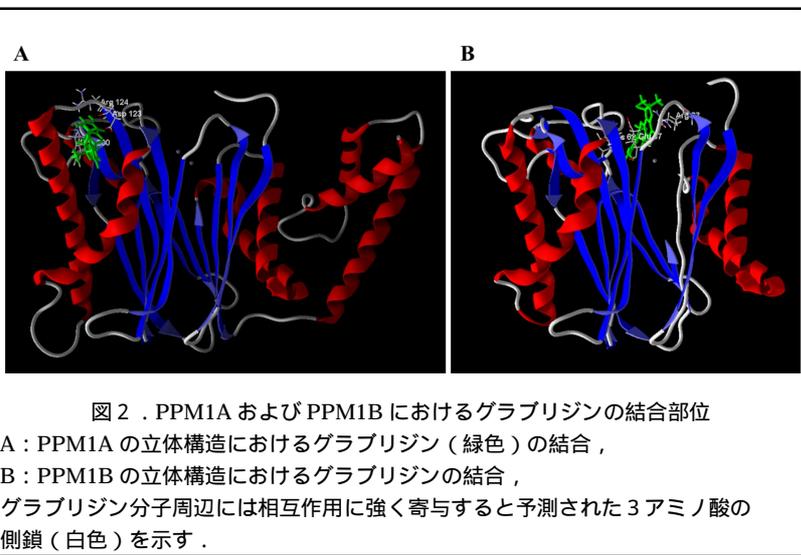
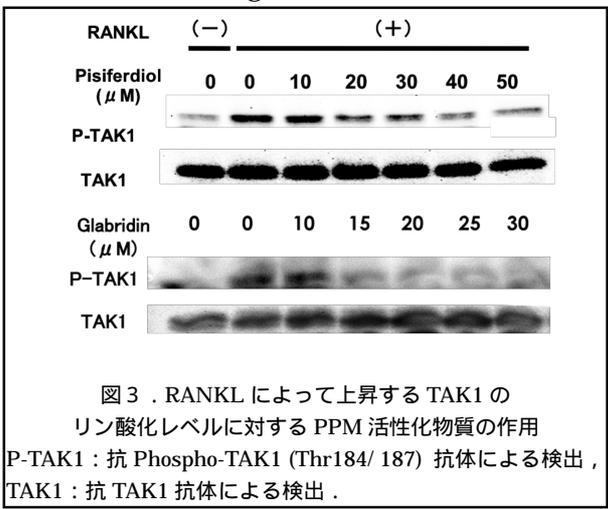


図 2 . PPM1A および PPM1B におけるグラブリジン (緑色) の結合部位
A : PPM1A の立体構造におけるグラブリジン (緑色) の結合,
B : PPM1B の立体構造におけるグラブリジン (緑色) の結合,
グラブリジン分子周辺には相互作用に強く寄与すると予測された 3 アミノ酸の側鎖 (白色) を示す .

(2) 破骨細胞分化シグナルにおける PPM ホスファターゼ活性化物質の作用解明

RAW264 細胞に sRANKL を添加すると、10 分以内に TAK1 の Thr187 がリン酸化、活性化される。このリン酸化レベルに対する glabridin と pisiferdiol の作用を検討した結果、両方の化合物とも TAK1 のリン酸化を抑制することが明らかとなった(図 3)。このことからこれらの化合物は TAK1 の活性化を抑制することによって、破骨細胞分化を抑制することが示唆された。



(3) 成熟脂肪細胞における PPM ホスファターゼ活性化物質の脂肪蓄積抑制効果

成熟脂肪細胞の脂肪合成に対する pisiferdiol と glabridin の効果

3T3-L1 細胞を成熟脂肪細胞に分化させた後、PPM 活性化物質存在下で培養し、Oil Red O 色素量に基づく脂肪滴蓄積量を定量した。その結果、glabridin と pisiferdiol はともに成熟脂肪細胞における脂肪滴の蓄積を抑制することが明らかとなった (図 4)。

脂肪細胞分化に対する pisiferdiol と glabridin の効果

PPM1B は PPAR の転写活性の制御に関わることが報告されている。そこで glabridin と pisiferdiol が PPAR を介して脂肪細胞分化を促進することにより、脂肪細胞の肥大化による脂肪蓄積が抑制される可能性を検討するため、脂肪細胞分化に対するこれらの化合物の影響を評価した。その結果、rosiglitazon では顕著な脂肪滴蓄積量の増加が見られ、脂肪細胞への分化が促進されたが、glabridin および pisiferdiol ではコントロールと比較して顕著な吸光度の差は見られず、脂肪細胞分化に対する促進効果は認められなかった。

AMPK に対する pisiferdiol と glabridin の作用

AMPK は細胞におけるエネルギー代謝の主要な制御因子の 1 つであり、脂質合成を抑制制御する。そこで insulin による AMPK の活性化に対する glabridin および pisiferdiol の効果を検討した結果、これらの化合物を加えると AMPK のリン酸化レベルがいずれも上昇することが明らかとなった。これまでに PPM1A や PPM1B は AMPK の Thr172 を脱リン酸化することによって、不活性化することが報告されているため、PPM 活性化物質により AMPK のリン酸化が促進される結果は予想とは逆であった。そこで Thr172 の前後の 17 アミノ酸から成るリン酸化ペプチドを基質として、PPM1B の活性に対する glabridin の効果の評価したところ、glabridin は PPM1B の活性を阻害することが明らかとなった。以上の結果から、glabridin は PPM1B との相互作用により、AMPK に対する PPM1B の活性を阻害することによって AMPK を活性化し、脂肪滴蓄積を抑制する可能性が示唆された。

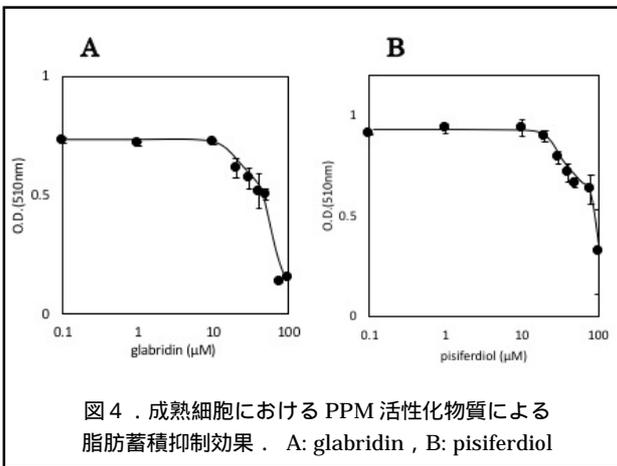


図 4 . 成熟細胞における PPM 活性化物質による脂肪蓄積抑制効果 . A: glabridin , B: pisiferdiol

(4) PPM1D 阻害物質の探索

PPM1D 遺伝子は様々な癌で増幅や過剰発現が認められる癌遺伝子として知られており、その阻害物質は癌の予防や治療への展開が期待されている。種々の置換基を有するジアリールジカルコゲニド (Ar-E-E-Ar; E=S, Se, Te; Ar=主に置換ベンゼン) の PPM1D に対する阻害活性を比較したところ、カルコゲン原子の種類とアリール基の種類および位置により活性が大きく異なった (図 5 および図 6)。その中で、ベンゼン環上にハロゲンおよび 3 位にニトロ基が置換

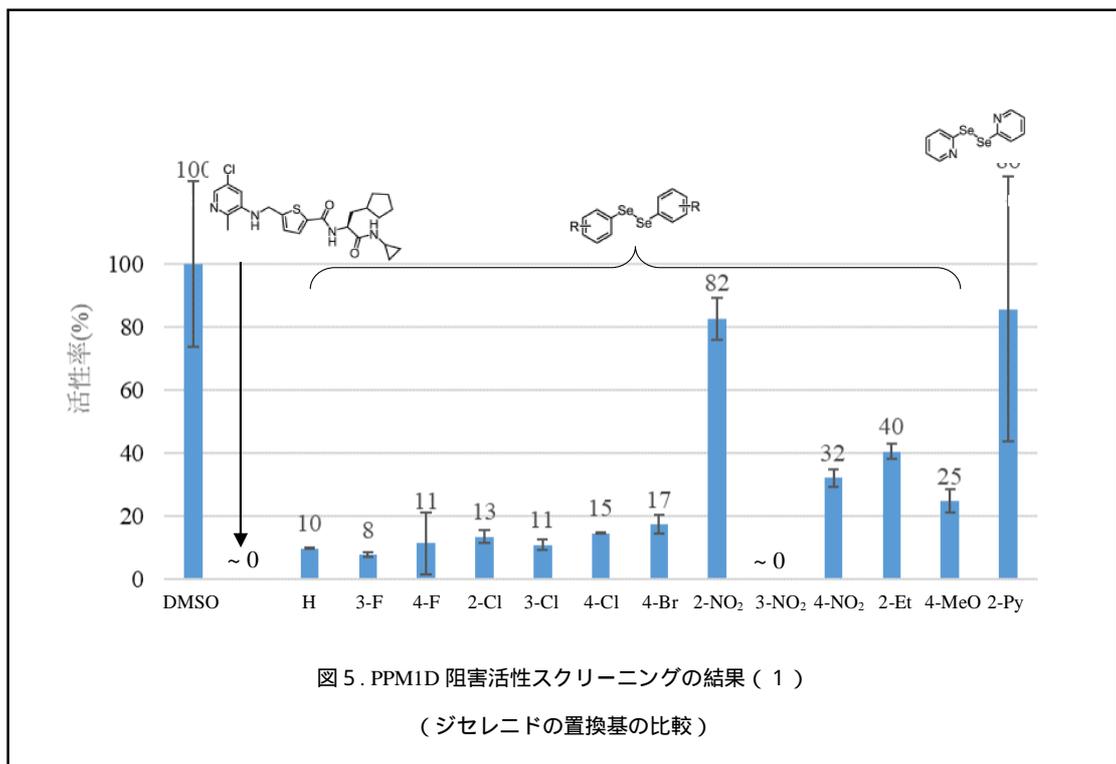
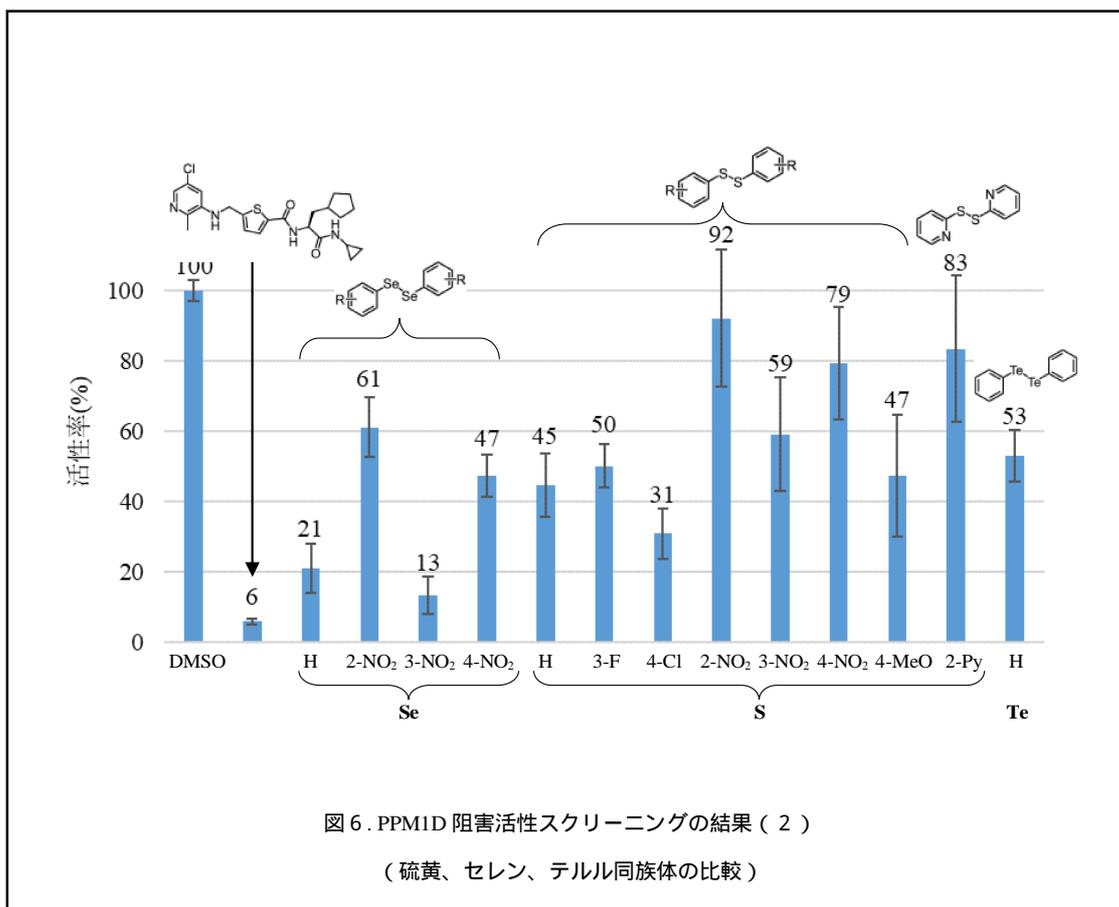


図 5 . PPM1D 阻害活性スクリーニングの結果 (1)

(ジセレンドの置換基の比較)

したジフェニルジセレンドの阻害活性が高い傾向が示された。ジフェニルジカルコゲニド (Ph-E-E-Ph, E=S, Se, Te) を比較すると、ジセレンドが最も活性が高く、Se > S > Te の順で阻害能の低下が見られた。ジセレンドにおける置換基の影響を比較すると、ベンゼン環にハロゲンが置換した場合、その種類や位置の違い (3-F, 4-F, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 4-Br) による活性の変化はあまり見られなかった。一方、ニトロ置換体では置換基の位置により阻害活性に大きな違いが見られ、3-NO₂ > 4-NO₂ > 2-NO₂ の順に活性が低下した。以上の検討の結果、これまでに同定した化合物よりも高い PPM1D 阻害活性を持つ化合物としてビス(3-ニトロフェニル)ジス



ルフィドを同定し、出願を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計17件)

Shimizu E, Koshino H, Noro A, Maruyama M, Shimoda N, Uesugi S, Ohnishi M, Kimura KI. Isolation of a spirolactone norditerpenoid as a yeast Ca²⁺ signal transduction inhibitor from Kuji amber and evaluation of its effects on PPM1A activity. *Fitoterapia*. 2019. 134:290-296. doi: 10.1016/j.fitote.2019.02.027.

河村麻希, 大西素子, 堤内 要. 6-および7-ホスホノメチルナフタレン-1-カルボン酸の化学合成. 中部大学生物機能開発研究所紀要 2018. 18:62-69. https://elib.bliss.chubu.ac.jp/webopac/bdyview.do?bodyid=XC18000064&elmid=Body&fname=F01_018_062.pdf&loginflg=on&lnkflg=true&block_id=_296&once=true

Fujiwara N, Lee JW, Kumakami-Sakano M, Otsu K, Woo JT, Iseki S, Ota MS. Harmine promotes molar root development via SMAD1/5/8 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. 497(3):924-929. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.062.

Kusano R, Fujita K, Shinoda Y, Nagaura Y, Kiyonari H, Abe T, Watanabe T, Matsui Y, Fukaya M, Sakagami H, Sato T, Funahashi JI, Ohnishi M, Tamura S, Kobayashi T. Targeted disruption of the mouse protein phosphatase ppm1l gene leads to structural abnormalities in the brain. *FEBS Lett.* 2016. 590(20):3606-3615. doi: 10.1002/1873-3468.12429.

[学会発表](計27件)

澤本 佳佑, 饒村 修, 後藤 保, 大西 素子. アリールジセレンドの合成とプロテインホスファターゼ阻害能. 第49回中部化学関係学協会支部連合 秋期大会. 2018年.

澤本 佳佑, 神谷 憲児, 沢柳 大, 依藤 知洋, 饒村 修, 加藤 友佳, 大西 素子. 種々のアリールセラニル基を有する化合物の合成とプロテインホスファターゼ阻害能. 日本薬学会第138年会. 2018年.

西尾彩花, 鵜飼容子, 佐竹一紘, 中川大, 木村賢一, 大西素子. プロテイン Ser/Thr ホスファターゼ活性化物質の脂肪細胞における脂肪蓄積抑制効果. 第 81 回日本生化学会中部支部例会. 2017 年.

鵜飼容子, 佐竹一紘, 中川大, 木村賢一, 大西素子. PPM1 活性化物質は成熟脂肪細胞における脂肪滴の蓄積を抑制する. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 2017 年.

鵜飼 容子, 青山 友果, 伊藤 守弘, 大西 素子. プロテインホスファターゼ阻害剤による抗 CD98 抗体依存性細胞融合の阻害. 第 80 回日本生化学会中部支部例会. 2016 年.

岩崎 祐太, 青山 友果, 鵜飼 武寛, 鵜飼 容子, 饒村 修, 大西 素子. 癌遺伝子産物 PPM1D を阻害する低分子化合物. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016 年.

鵜飼容子, 青山友果, 鵜飼武寛, 饒村修, 大西素子. プロテイン Ser/Thr ホスファターゼ Wip1 阻害剤の同定とその性質. 第 28 回日本動物細胞工学会 2015 年度大会. 2015 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: プロテインホスファターゼ阻害剤

発明者: 大西素子, 饒村修

権利者: 学校法人中部大学

種類: 特許

番号: 特許願 2017-142869

出願年: 平成 29 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

https://www3.chubu.ac.jp/faculty/ohnishi_motoko/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 禹 済泰

ローマ字氏名: (WOO, je-tae)

所属研究機関名: 中部大学

部局名: 応用生物学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 20272693

研究分担者氏名: 饒村 修

ローマ字氏名: (NIYOMURA, osamu)

所属研究機関名: 中部大学

部局名: 工学部

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 20365175

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。