

平成21年6月9日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19570142
 研究課題名（和文） ホスファターゼ分子群による、情報ネットワークの制御機構
 研究課題名（英文） Regulation of cell function by protein phosphatases
 研究代表者
 島 礼（SHIMA HIROSHI）
 宮城県立がんセンター研究所・薬物療法学部・部長
 研究者番号 10196462

研究成果の概要：

我々は、2種類の蛋白質脱リン酸化酵素（PP1/セリンスレオニンプロテインホスファターゼ1型 および DUSP26）について、それらの酵素の働きを明らかにした。さらに癌における遺伝子レベルの異常を解明し、それらを指標とする新たな癌診断、およびそれらを標的にした抗癌剤の開発につながる重要な発見をした。これらの内容は、アメリカ生化学分子生物学会誌（JBC 誌）、および英国ネイチャー出版の学術誌 Oncogene 誌で発表された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：プロテインホスファターゼ、PP1、スプライシング、SAP155、NIPP1、DUSP26、癌、細胞間接着、モータータンパク

1. 研究開始当初の背景

我々は、以下の2つ（PP1 および DUSP26）のプロテインホスファターゼに関して以下のような知見を得ていた。

（1）PP1によるスプライシングの制御

PP1結合タンパクであるNIPP1が、核内でspeckle様に分布することを見出していた。そこでPP1/NIPP1の複合体がスプライシン

グを脱リン酸化により制御するのではないかと考えて研究を開始した。

（2）DUSP26による抗がん作用

DUSP26は、脳特異的に発現している2重基質性プロテインホスファターゼであることを見出していた。その機能は未知であったが、DUSP26の発現が神経膠種の手術サンプルにおいて著しく発現が下がっていることを見

出したので、DUSP26 が発がん と密接な関係を持つと考え、その機構を明らかにする研究を開始した。

2. 研究の目的

我々は、以下の 2 つのプロテインホスファターゼの機能解明を目指した。

(1) PP1 によるスプライシングの制御

PP1/NIPP1 のターゲットとなるタンパクの同定、mRNA のスプライシング制御の機構を明らかにすることを目的とした。

(2) DUSP26 による細胞制御

DUSP26 の脳における機能解明、およびその破綻と癌との関係を明らかにするために、①基質を同定する事、②その脱リン酸化の意義を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) PP1 によるスプライシングの制御

NIPP1 と共発現させたグロビン遺伝子 mRNA への結合の有無、NIPP1 の強制発現やノックダウンによるスプライシングへの影響を調べた。スプライソゾームにおける PP1/NIPP1 の器質の同定を行った。

(2) DUSP26 による細胞制御

酵母 2 ハイブリッドスクリーニングにより、DUSP26 の結合タンパクを同定し、そのタンパクの脱リン酸化による機能の制御を調べた。

4. 研究成果

(1) PP1 によるスプライシングの制御

具体的には以下の 4 つを明らかにした

- ①PP1 の結合タンパクとして知られていた NIPP1 が、PP1 をスプライソゾームにターゲットする機能があることを見いだした。
- ②PP1/NIPP1 複合体が、スプライシング因子の中で、SAP155 のみを特異的に脱リン酸化することを見いだした。
- ③NIPP1 の C 末端を欠損させることにより、PP1/NIPP1 複合体は、その脱リン酸化活性を異常に亢進させることを見いだした。
- ④PP1/NIPP1 複合体の異常な活性化が、スプ

ライシングの阻害を引き起こし、細胞死を誘導することを見いだした。

本研究成果の最も大きい意義は、遺伝子に書き込まれた情報を生体内で実際に機能するよう編集する仕組み「スプライシング」メカニズムの一端を解明し、スプライシングを抑制してがん細胞に細胞死を誘導できる抗癌剤標的を新たに発見したことである。

生命の設計図たる遺伝情報は遺伝子 DNA 上に断片化された形で記録されており、この情報を生物の体内で実際に利用可能な状態にするためには、遺伝子のコピーをまず作製し、そのコピーから必要部分だけをピックアップして繋ぎなおし、mRNA という直接の設計図に変換する必要がある。この仕組みは「スプライシング」と呼ばれており、癌細胞では特にスプライシングに対する依存が高くなっている可能性が指摘されている。我々は、これまで機能がよく分かっていなかった「NIPP1-PP1」という酵素がスプライシングのために重要であることを突き止めた。また、ヒトの癌細胞で NIPP1-PP1 酵素の働きを変化させたところ、スプライシングが阻害され、がん細胞が自ら死んでいくように仕向けることができた。

癌の治療においては、さまざまな抗癌剤が使用されているが、薬の効き方・ターゲットという点で分類すると実は数種類しかない。今回の成果によって、NIPP1-PP1 を標的にして、これまでの抗がん剤とは全く違ったタイプの抗がん剤（スプライシング阻害抗がん剤）を開発する道が拓けた。

(2) DUSP26 による細胞制御

酵母 2 ハイブリッドスクリーニングにて、DUSP26 の結合タンパクとして KIF3A が得られた DUSP26 が、神経膠種細胞の悪性度のマーカー、さらには治療の標的となることが考えられた。

KIF3A は、KIF3B と KAP3 と共に 3 量体を作り、微小管において様々な cargo を運搬する作用をモータータンパクであることが知られていたため、DUSP26 の KIF3 モーターへの影響を調べ、以下の事が明らかとなった。

- ①DUSP26 は、KAP3 を特異的に脱リン酸化をする。
- ②DUSP26 はホスファターゼ活性依存的に細胞の接着を強める。

③DUSP26 は、ホスファターゼ活性依存的に N-cadherin や β -catenin の膜への輸送を増強する。

以上のことより、DUSP26 は正常のアストロサイトにおいて細胞の接着に重要な働きを持ち、その発現が減少していることが、神経膠種細胞の高い浸潤性と関係があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ①Tanuma N, Nomura M, Ikeda M, Kasugai I, Tsubaki Y, Takagaki K, Kawamura T, Yamashita Y, Sato I, Sato M, Katakura R, Kikuchi K, Shima H.
Protein phosphatase Dusp26 associates with KIF3 motor and promotes N-cadherin-mediated cell-cell adhesion.
Oncogene 28:752-761, 2009
- ②Kumeta H, Ogura K, Adachi S, Fujioka Y, Tanuma N, Kikuchi K, Inagaki F.
The NMR structure of the NIPPI FHA domain
J Biomol NMR, 40(3):219-24, 2008
- ③Mitsuhashi S, Shima H, Li Y, Tanuma N, Okamoto T, Kikuchi K, Ubukata M.
Tautomycin suppresses the TNF α /NF κ B pathway via inhibition of IKK activation
International Journal of Oncology 33(5): 1027-1035, 2008
- ④Tanuma N, Kim S-E, Beullens M, Tsubaki Y, Mitsuhashi S, Nomura M, Kawamura T, Isono K, Koseki H, Sato M, Bollen M, Kikuchi K, Shima H.
Nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPPI) directs protein phosphatase-1 (PP1) to dephosphorylate the U2 snRNP component, spliceosome-associated protein 155 (Sap155)
Journal of Biological Chemistry 283(51) 35805-35814, 2008
- ⑤Mitsuhashi S, Saito A, Nakajima N, Shima

H, Ubukata M

Pyrogallol structure in polyphenol is involved in apoptosis-induction on HEK293T and K562 cells.

Molecules, 13(12):2998-3006, 2008

- ⑥Takagaki K, Shima H, Tanuma N, Nomura M, Satoh T, Watanabe M, Kikuchi K.
Characterization of a novel low-molecular-mass dual specificity phosphatase-4 (LDP-4) expressed in brain.
Molecular and Cellular Biochemistry, 296(1-2):177-84. 2007

[学会発表] (計 13 件)

- ① Nobuhiro Tanuma, Kunimi Kikuchi, Hiroshi Shima
NIPPI Directs PP1 to Dephosphorylate the Essential Pre-mRNA Splicing Factor, Sap 155
8th International Conference on Cellular Regulation by Protein Phosphatases "Protein Phosphatases: From Genome to Disease" (Maebashi, Japan, 2008. 11. 12-14)
- ② 田沼延公、椿耶緒、野村美有樹、菊池九二三、島礼
PP1/NIPPI 複合体による U2snRNP の Sap155/Sf3b1 構成タンパク、Sap155/Sf3b1 の脱リン酸化
BMB2008 第 31 回日本分子生物学会第 81 回日本生化学会合同大会 シンポジウム 「3S22 ホスファターゼスーパーファミリーの機能と異常:ゲノムから疾患まで」 (神戸, 2008. 12. 9-12)
- ③ 野村美有樹、田沼延公、高垣謙太郎、島礼
DUSP26 は KIF3A と結合し KAP3 の脱リン酸化を促進する
第 67 回日本癌学会総会, (名古屋, 2008. 10. 28-30)
- ④ 田沼延公、野村美有樹、島礼
ホスファターゼ PP1-NIPPI ホロ酵素による U2snRNP の Sap155/Sf3b1 サブユニットの脱リン酸化
Phosphatase PP1-NIPPI holoenzyme de-phosphorylates Sap155/Sf3b1 of U2snRNP

- 第 67 回日本癌学会総会, (名古屋, 2008. 10. 28-30)
- ⑤ 田沼延公, 椿耶緒, 野村美有樹, 菊池九二三, 島礼
 プロテインホスファターゼ PP1/NIPP1 複合体による Sap155/Sf3b1 の脱リン酸化と splicing 制御機構
 BMB2008 第 31 回日本分子生物学会第 81 回日本生化学会合同大会 (神戸, 2008. 12. 9-12)
- ⑥ 野村美有樹, 田沼延公, 池田正稔, 春日井勲, 菊池九二三, 島礼
 DUSP26 によるキネシンモーターKIF3 の制御および Cadherin 依存性細胞接着の亢進
 BMB2008 第 31 回日本分子生物学会第 81 回日本生化学会合同大会 (神戸, 2008. 12. 9-12)
- ⑦ Nobuhiro Tanuma, Shinya Mitsuhashi, Miyuki Nomura, Yao Tsubaki, Sei-Eun Kim, Kunimi Kikuchi, Hiroshi Shima
 PP1 de-regulation by a mutant form of NIPP1 lacking the C-terminal region
 EUROPHOSPHATASES 2007, Protein Phosphatases in Health and Disease (Aveiro, Portugal, 2007. 07. 24-28)
- ⑧ Miyuki Nomura, Kentaro Takagaki, Nobuhiro Tanuma, Kumimi Kikuchi, Hiroshi Shima
 Characterization of LDP-4, a cancer-associated dual-specificity phosphatase
 EUROPHOSPHATASES 2007, Protein Phosphatases in Health and Disease (Aveiro, Portugal, 2007. 07. 24-28)
- ⑨ Hiroshi Shima, Chiaki Katagiri, Kouhei Masuda, Miyuki Nomura, Isao Kasugai, Nobuhiro Tanuma
 Function of MKP-7, at chromosome 12p, towards MAPK cascade
 Mechanisms and Models of Cancer Meeting (San Diego, 2007. 08. 08-12)
- ⑩ 野村美有樹, 高垣謙太郎, 田沼延公, 菊池九二三, 島礼
 Low-molecular-mass dual specificity phosphatase-4(LDP-4) functions as an activator of JNK and p38.
 第 66 回日本癌学会総会, (横浜, 2007. 10. 03-05)
- ⑪ 田沼延公, 高垣謙太郎, 野村美有樹, 菊池九二三, 島礼
 LDP-4, a cancer-associated dual-specificity protein phosphatase binds kinesine
 第 66 回日本癌学会総会 (横浜, 2007. 10. 03-05)
- ⑫ 田沼延公, 金世殷, 椿耶緒, 島礼, 三橋進也, 野村美有樹, 菊池九二三
 NIPP1-PP1c ホロ酵素による U2snRNP コンポーネント Sap155/SF3b1 の脱リン酸化
 BMB2007 第 30 回日本分子生物学会第 80 回日本生化学会合同大会 (横浜, 2007. 12. 11-15)
- ⑬ 野村美有樹, 田沼延公, 高垣謙太郎, 菊池九二三, 島礼
 二重基質特異性ホスファターゼ LDP-4 とキネシンの結合
 BMB2007 第 30 回日本分子生物学会第 80 回日本生化学会合同大会 (横浜, 2007. 12. 11-15)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pref.miyagi.jp/mcc/htdocs/kenkyu/yakubutu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島 礼 (SHIMA HIROSHI)

宮城県立がんセンター研究所・薬物療法学部・部長

研究者番号：10196462

(2) 研究分担者

田沼 延公 (TANUMA NOBUHIRO)

宮城県立がんセンター研究所・薬物療法学部・研究員

研究者番号：40333645

野村 美有樹 (NOMURA MIYUKI)

宮城県立がんセンター研究所・薬物療法学部・技師

研究者番号：40390893