

機関番号 : 10101
研究種目 : 若手研究 (B)
研究期間 : 2008~2010
課題番号 : 20770095
研究課題名 (和文) p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D スプライシング多型による発がん機構の解明
研究課題名 (英文) Analysis of splicing variant of p53-inducible phosphatase PPM1D on carcinogenesis
研究代表者 中馬 吉郎 (CHUMAN YOSHIRO) 北海道大学・大学院理学研究院・助教 研究者番号 : 40372263

研究成果の概要 (和文) :

p53 誘導性 Ser/Thr ホスファターゼである PPM1D の選択的スプライシングバリエント・PPM1D430 を mRNA およびタンパク質レベルで同定した。PPM1D430 はホスファターゼ活性を有しており、*in vitro* および *in vivo* で p53 を脱リン酸化した。さらに、PPM1D430 は精巣および白血球に特異的に発現し、免疫応答や精子形成に重要な役割を果す可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) :

PPM1D is a PPM1 type protein phosphatase and is induced in response to DNA damage. In our current study, we identify and characterize an alternative splicing variant (denoted PPM1D430) of human PPM1D at both the mRNA and protein level. PPM1D430 comprises the common 420 residues of the known PPM1D protein (PPM1D605) and contains a stretch of PPM1D430-specific 10 amino acids. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that PPM1D430 mRNA is also induced in response to the genotoxic stress in a p53-dependent manner. *In vitro* phosphatase analysis and PPM1D430-specific RNA interference analysis further indicated that PPM1D430 can dephosphorylate Ser15 of human p53 both *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, expression profiling of this gene by RT-PCR analysis of a human tissue cDNA panel revealed that PPM1D430 is expressed exclusively in testes and in leukocytes whereas PPM1D605 is ubiquitous. In addition, PPM1D430 shows a different subcellular localization pattern and protein stability when compared with PPM1D605 under some conditions. Our current findings thus suggest that PPM1D430 may exert specific functions in immune response and/or spermatogenesis.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野 : 生物学

科研費の分科・細目 : 生物科学・こうその調節

キーワード：ホスファターゼ、スプライシング

1. 研究開始当初の背景

PPM1 タイプ Ser/Thr ホスファターゼに属する PPM1D は、乳がんなどの複数のがん細胞において過剰発現し、細胞のがん化に寄与しているとの報告がある一方、神経膠芽腫細胞を用いた PPM1D の過剰発現解析では、逆にコロニー形成を抑制することが報告されている。また、PPM1D ノックアウトマウスの解析より、PPM1D が細胞の癌化のみならず、免疫応答や精子形成、寿命決定など多様な機能を有することが報告されているが、その作用メカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

当研究室のこれまでの研究成果より、PPM1D の機能多様性発現メカニズムには PPM1D スプライシングバリエントの存在が深く関与することが考えられた。そこで、本研究では、「PPM1D スプライシングバリエントを区別した細胞解析系を構築し、PPM1D スプライシング多型による真の細胞周期制御の解明」を目的とした。多機能タンパク質として機能する PPM1D の多様性機能発現メカニズム、ならびにその制御機構が解明できれば、PPM1D による細胞がん化制御機構を解明できるだけでなく、これまで明らかにされていない免疫不全、生殖異常、老化現象における PPM1D の作用機序解明への展開が期待される。

3. 研究の方法

PPM1D スプライシング多型の機能解明のため、以下の実験を実施した。

- (1) 新規スプライシングバリエントの mRNA レベルの解析
 - ①新規スプライシングバリエントの全長配列の決定
 - ②正常組織における発現パターン解析
 - ③各種がん細胞における発現解析
 - ④遺伝毒性ストレスによる誘導解析
 - ⑤血球細胞における発現パターン解析
- (2) 新規スプライシングバリエントのタンパク質レベルでの機能解析
 - ①スプライシングバリエント特異的抗体の作製
 - ②各種がん細胞における発現パターン解析
 - ③細胞内局在解析
 - ④in vitro ホスファターゼ活性測定
 - ⑤siRNA ノックダウンによる内在性 PPM1D の機能解析
 - ⑥免疫沈降による新規結合タンパク質の同定

4. 研究成果

本研究により、これまで報告されていた PPM1D605 に加え、430 残基からなる新規な選択的スプライシングバリエント・PPM1D430 を発見した。PPM1D430 は PPM1D605 と同様の基質選択性を示す一方、PPM1D605 が核内のみに局在するに対し、固有の C 端フラグメントを有する PPM1D430 は、核内に加え細胞膜や細胞質にも局在することを示した。さらに、PPM1D430 はコピキタスに発現する PPM1D605 と異なり、白血球と精巣に特異的に発現していることを明らかにした。本論文は、PPM1D の制御する免疫応答や精子形成において PPM1D430 が中心的な役割を果たしていることを示唆しており、国内外で高い評価を得るとともに今後多くの論文引用が予想される。

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 23 件)

1. Chuman, Y., Iizuka, K., Honda, T., Onoue, H., Shimohigashi, Y., and Sakaguchi, K. “Phosphatase assay for multi-phosphorylated substrates using phosphatase specific-motif antibody” J. Biochem., 査読有 in press (2011)
2. Martin-Manso, G., Calzada, M.J., Chuman, Y., Sipes, J.M., Xavier, C.P., Wolf, V., Kuznetsova, S.A., Rubin, J.S., and Roberts, D.D. “sFRP-1 binds via its netrin-related motif to the N-module of thrombospondin-1 and blocks thrombospondin-1 stimulation of MDA-MB-231 breast carcinoma cell adhesion and migration.” Arch. Biochem. Biophys., 査読有 509(2), 147-156, (2011)
3. Nomura, T., Kamada, R., Ito, I., Sakamoto, K., Chuman, Y., Ishimori, K., Shimohigashi, Y., and Sakaguchi, K. “Probing phenylalanine environments in oligomeric structures with pentafluorophenylalanine and cyclohexylalanine.” Biopolymers, 査読有 95(6), 410-419, (2011)
4. Kamada, R., Yoshino, W., Nomura, T., Chuman, Y., Imagawa, T., Suzuki, T., Sakaguchi, K. “Enhancement of transcriptional activity of mutant p53

- tumor suppressor protein through stabilization of tetramer formation by calix[6]arene derivatives” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有 20(15), 4412-4415, (2010)
5. Asanomi, Y., Kobayashi, Y., Sakai, H., Masuda, T., Chen, X., Chuman, Y., Uosaki, K., Sakaguchi, K. “Drastic Effects on Fibril Formation of Amyloid-beta Peptides by the Addition of Amino Acid Residue Units to the Termini” *Protein Pept. Lett.*, 査読有 17(4), 458-463, (2010)
 6. Osada, S., Sano, S., Ueyama, M., Chuman, Y., Kodama, H., and Sakaguchi, K. “Fluoroalkene Modification of Mercaptoacetamide-based Histone Deacetylase Inhibitors” *Bioorg. Med. Chem.* 査読有 18(2), 605-611, (2010)
 7. Yagi, H., Chuman, Y., and Sakaguchi, K. Characterization of Two Novel and Potent Inhibitors Specific for p53-Inducible Protein Phosphatase PPM1D. *Peptide Science* 2009, 査読有 455-456, (2010)
 8. Sakaguchi, T., Kamada, R., Nomura, T., Chuman, Y., Imagawa, T., and Sakaguchi, K. Biominalization Activity of Multivalent minTBP-1 Peptide Mediated by p53 Tetramerization Domain. *Peptide Science* 2009, 査読有 411-412, (2010)
 9. Watanabe, K., Sakai, H., Chen, X., Chuman, Y., and Sakaguchi, K. Development of Probed-SCAP Directed at Thiol Groups. *Peptide Science* 2009, 査読有 407-408, (2010)
 10. Kamada, R., Oshima, S., Chuman, Y., Imagawa, T., and Sakaguchi, K. Inhibition of p53 by Introducing Tetramerization Domain Peptide Fused with Polyvalent Cationic Sequence into Cells. *Peptide Science* 2009, 査読有 319-320, (2010)
 11. Chuman, Y., Kurihashi, W., Mizukami, Y., Nashimoto, T., Yagi, H., and Sakaguchi, K. “PPM1D430, a Novel Alternative Splicing Variant of the Human PPM1D, can Dephosphorylate p53 and Exhibits Specific Tissue Expression” *J. Biochem.*, 査読有 145(1), 1-12, (2009).
 12. Kamada, R., Terai, T., Nomura, T., Chuman, Y., Imagawa, T., Sakaguchi, K. Effects of tumor-associated mutations in the p53 tetramerization domain on oligomerization state and transcriptional activity. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 査読有 611, 567-568, (2009).
 13. Nomura, T., Kamada, R., Ito, I., Chuman, Y., Shimohigashi, Y., and Sakaguchi, K. “Oxidation of methionine residue at hydrophobic core destabilizes p53 tetrameric structure” *Biopolymers*, 査読有 91(1), 78-84, (2009).
 14. Chuman, Y., Kurihashi, W., Mizukami, Y., Nashimoto, T., Yagi, H., and Sakaguchi, K. PPM1D430, a Novel Alternative Splicing Variant of the Human PPM1D. *Peptide Science* 2008, 査読有 531-532 (2009).
 15. Nomura, T., Kamada, R., Chuman, Y., and Sakaguchi, K. Thermal Stability of p53 Tetramerization Domain Peptides Derived from Various Species. *Peptide Science* 2008, 査読有 35-36 (2009).
 16. Yagi, H., Chuman, Y., Yoshimura, F., Tanino, K., and Sakaguchi, K. Identification of Novel Chemical Inhibitors for p53-Inducible Protein Phosphatase PPM1D. *Peptide Science* 2008, 査読有 385-386 (2009).
 17. Sakai, H., Asanomi, Y., Kobayashi, Y., Chen, X., Chuman, Y., Masuda, T., Uosaki, K., and Sakaguchi, K. Extremely Long Nanofibrils of Functionalized Structure-Controlled-Amyloid Peptides Derived from Transthyretin. *Peptide Science* 2008, 査読有 465-466 (2009).
 18. Chuman, Y., Yagi, H., Fukuda, T., Nomura, T., Matsukizono, M., Shimohigashi, Y., and Sakaguchi, K. “Characterization of the Active Site and a Unique Uncompetitive Inhibitor of the PPM1-type Protein Phosphatase PPM1D” *Protein Pept. Lett.*, 査読有 15, 938-948, (2008).
 19. Polley, S., Guha, S., Roy, N.S., Kar, S., Sakaguchi, K., Chuman, Y., Swaminathan, V., and Roy, S. “Differential Recognition of Phosphorylated Transactivation Domains of p53 by

Different p300 Domains” J. Mol. Biol., 査読有 376, 8-12, (2008).

20. Kamada, R., Terai, T., Nomura, T., Chuman, Y., Imagawa, T., and Sakaguchi, K. Correlation of Oligomeric Structure and Transcriptional Activity of p53 Mutants. Peptide Science 2007, 査読有 69-70 (2008).

21. Nomura, T., Kamada, R., Chuman, Y., and Sakaguchi, K. Screening of Peptides to Stabilize the p53 Tetramer Formation from Phage Displayed Library. Peptide Science 2007, 査読有 315-316 (2008).

22. Miyazaki, H., Kamada, R., Nomura, T., Chuman, Y., Imagawa, T., and Sakaguchi, K. Correlation between Expression Level in E. coli and Stability of Oligomeric Structure of the p53 Tetramerization Domain. Peptide Science 2007, 査読有 317-318 (2008).

23. Kamada, R., Fukuda, K., Miyazaki, H., Nomura, T., Chuman, Y., Imagawa, T., Tanino, K., and Sakaguchi, K. Structural Photomodulation of Peptides with Azobenzoate Derivative in Peptide Backbone. Peptide Science 2007, 査読有 447-448 (2008).

[学会発表] (計 26 件)

(1) Yagi Y. Novel chemical inhibitors specific for p53-inducible protein phosphatase PPM1D, Anaheim Convention Center, Anaheim, USA 2011/3/29 Anaheim Convention Center, Anaheim, USA

(2) 小境 夕紀 脱リン酸化酵素 PPM1D 阻害剤 SPI-001 の阻害様式と核小体形成に対する効果, 日本化学会第 91 春季年会(2011) 2010/3/29 神奈川大学横浜キャンパス

(3) Chuman Y. Suppression of Breast Cancer Cells Proliferation by Novel Inhibitor for p53-Inducible Protein Phosphatase PPM1D, 1st International Symposium on Carcinogenic Spiral & 9th International Conference on Protein Phosphatase, 2011/2/1, Tetsumon Memorial Hall, The University of Tokyo

(4) Yagi H. Novel small molecule inhibitors specific for p53-inducible

protein phosphatase PPM1D, 1st International Symposium on Carcinogenic Spiral & 9th International Conference on Protein Phosphatase 2011/2/1 Tetsumon Memorial Hall, The University of Tokyo

(5) Kozakai Y. Increase in number of nucleoli by protein phosphatase PPM1D overexpression, 1st International Symposium on Carcinogenic Spiral & 9th International Conference on Protein Phosphatase 2011/2/1 Tetsumon Memorial Hall, The University of Tokyo

(6) 中馬 吉郎 p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D 阻害による乳がん細胞増殖抑制作用, BMB2010 第 83 回日本生化学会、第 33 回日本分子生物学会合同大会 2010/12/10 神戸ポートアイランド

(7) 八木 寛陽 p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D 特異的阻害剤 SPI-001 の相互作用, BMB2010 第 83 回日本生化学会、第 33 回日本分子生物学会合同大会 2010/12/10 神戸ポートアイランド

(8) 中馬 吉郎, PPM1D430, a Novel Alternative Splicing Variant of the Human PPM1D, can Dephosphorylate p53 and Exhibits Specific Tissue Expression, BMB2010 第 83 回日本生化学会 第 33 回日本分子生物学会合同大会 2010/12/9 神戸ポートアイランド

(9) Kozakai Y. Dephosphorylation of Nucleolar Protein Nucleophosmin by Protein Phosphatase PPM1D, 5th International Peptide Symposium in conjunction with 47th Japanese Peptide Symposium 2010/12/4 Kyoto International Conference Center

(10) Kozakai Y. Effect of Protein Phosphatase PPM1D on Nucleolus Formation, MPSA 2010 2010/8/25 Norrlands nation at Uppsala University in Uppsala, Sweden

(11) 中馬 吉郎 p53 誘導性ホスファターゼ特異的阻害剤の開発と細胞増殖抑制能, 日本化学会北海道支部 2010 年夏季研究発表会 2010/7/24 函館高専

(12) 中馬 吉郎 p53 誘導性ホスファター

ゼのサプライシングバリエーションの同定と阻害剤開発, 第 47 回日本生化学会北海道支部例会(招待講演) 2010/7/23 北海道大学医学部第3講堂

(13) 八木 寛陽 p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D 阻害剤における特定に配向する疎水性部位, 第 47 回日本生化学会北海道支部例会 2010/7/23 北海道大学医学部第3講堂

(14) 小境 夕紀 PPM1D ホスファターゼ過剰発現が核小体形成に及ぼす影響, 第 47 回日本生化学会北海道支部例会 2010/7/23 北海道大学医学部第3講堂

(15) 梨本 健紘 p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D の新規阻害剤, 日本薬学会第 130 年会 2010/3/29 岡山桃太郎アリーナ (岡山)

(16) 中馬 吉郎 p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D に対する新規阻害剤の開発, 第 4 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 2009/11/13 熊本大学 (熊本)

(17) Yagi H. Characterization of Two Novel and Potent Inhibitors Specific for p53-Inducible Protein Phosphatase PPM1D, 第 46 回ペプチド討論会 2009/11/4 北九州国際会議場(小倉・北九州)

(18) 八木 寛陽 p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D の基質認識と阻害剤開発, 第 42 回若手ペプチド夏の勉強会 2009/8/2 八王子セミナーハウス(東京・八王子)

(19) 八木 寛陽 p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D に対するシリン基を持つ低分子阻害剤, 日本生化学会北海道支部第 46 回例会 2009/7/17 旭川医科大学 (旭川)

(20) Kurihashi W. Identification and characterization of novel alternative splicing variant of p53-inducible protein phosphatase PPM1D, 第 8 回ホスファターゼカンファレンス 2008/11/14 前橋テルサ (群馬)

(21) 中馬 吉郎 ヒト PPM1D の選択的サプライシングバリエーション PPM1D430, 第 45 回ペ

プチド討論会 2008/10/31 タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

(22) 八木 寛陽 Identification of novel chemical inhibitors for p53-inducible protein phosphatase PPM1D, 第 45 回ペプチド討論会 2008/10/31 タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

(23) Chuman Y. An Alternative Splicing Variant of the PPM1 Protein Phosphatase PPM1D, MPSA2008 2008/8/26 北海道大学 (札幌市)

(24) Yagi H. Novel chemical inhibitors for p53-inducible protein phosphatase PPM1D, MPSA2008 2008/8/26 北海道大学 (札幌市)

(25) 中馬 吉郎 リン酸化と脱リン酸化によるタンパク質制御機構~p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D を中心にして~, 第 41 回若手ペプチド夏の勉強会 2008/8/5 プライムイン城陽 (京都・城陽市)

(26) 中馬 吉郎 癌抑制タンパク質 p53 誘導性ホスファターゼの Alternative splicing variant, 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008/5/27 京王プラザホテル (札幌)

[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: 坂口和靖、谷野圭持、中馬吉郎、
吉村文彦、八木寛陽

権利者: LCIP

種類: 特許

番号: 特願 2008-262646, PCT 出願
PCT/JP2009/005128, 国際公開番号:
W02010041401 A1

出願年月日: 2008 年 10 月 9 日

国内外の別: 国内・国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中馬 吉郎 (CHUMAN YOSHIRO)

北海道大学・大学院理学院・助教

研究者番号: 40372263

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究連携者

なし