

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21503

研究課題名（和文）プロリン異性化タンパク質の網羅的同定法の開発

研究課題名（英文）Development of a comprehensive identification method for proline isomerization proteins

研究代表者

島田 緑（Shimada, Midori）

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：60444981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：乳がんの治療標的因子として同定したFKBP52の基質を探索するために、FKBP52と結合するタンパク質を同定した。その中で細胞増殖に關与する重要な因子であり、かつユビキチンリガーゼに絞込みで解析を進めた結果、BRCA1を取得した。詳細な解析により、FKBP52はBRCA1と結合し、エストロゲン受容体（ER）の安定性を増加させていることが明らかとなった。さらにFKBP52の異性化酵素活性がERの安定化に寄与していることが明らかとなった。FKBP52と結合する因子の中で基質となる候補因子について、in vitroプロリン異性化酵素アッセイ系を樹立し、基質であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FKBPは細胞増殖や転写などの重要な生命現象に關与しているが、詳細な機能はあまりわかっていない。その理由は、PPIaseが標的とする基質の同定が困難であることが推測される。さらにFKBPにはコシャペロンとして働く機能と、プロリン異性化酵素としての機能があるが、酵素活性が生命現象に重要であるかについてはあまり知られていない。研究代表者はin vitroの異性化酵素アッセイ系を確立し、これまでほとんど同定されていなかったFKBPの基質を同定することに成功した。基質を同定することができれば、プロリンの異性化が司る細胞増殖の機能に關する生命現象の理解が大きく展開することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：To search for substrates of FKBP52, which was identified as a therapeutic target factor for breast cancer, we identified proteins that bind to FKBP52. Among them, BRCA1 was obtained as a result of narrowing down the analysis to ubiquitin ligases, which are important factors involved in cell proliferation. Detailed analysis revealed that FKBP52 binds to BRCA1 and increases the stability of estrogen receptor (ER). Furthermore, the isomerase activity of FKBP52 was found to contribute to ER stabilization, and an in vitro proline isomerase assay system was established for candidate substrates among the factors that bind to FKBP52 and were found to be substrates.

研究分野：分子生物学

キーワード：プロリン異性化酵素 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

ペプチジルプロリルイソメラーゼ (PPIase) は、プロリンの異性化反応を触媒しタンパク質の高次構造を変化させる。PPIase には FKBP (FK506 Binding Protein)、シクロフィリンおよび Pin1 の3つのファミリーが存在する。研究代表者がこれまで乳がんの悪性化に寄与する、新規治療標的因子として FKBP52 を同定した。これまで FKBP52 は免疫抑制剤 FK506 と結合する PPIase の一種で核内受容体や Tau の制御をすることが知られている。FKBP はヒトでは 16 種類存在し、FKBP52 と最も相同性の高い因子として FKBP51 が存在する。FKBP51 および FKBP52 は細胞増殖、転写など重要な生命現象に関与することが知られているが、詳細な分子機構はほとんど分かっていない。その原因は PPIase の基質同定の困難さであると考えられる。研究代表者はレンチウイルスを用いたコンディショナルノックダウンにより、FKBP52 が乳がん細胞、前立腺がん細胞の増殖に必須であり、FKBP51 は前立腺がん細胞の増殖に必須であることを明らかにした。さらに FKBP51 の酵素活性阻害薬を合成し、全ての FKBP の中で初めて FKBP51 の酵素活性が細胞増殖に必須であることを発見した。しかしながら FKBP51、FKBP52 の基質はほとんど不明である。そこで研究代表者は FKBP の異性化の基質を同定し、その異性化の意義を明らかにすることが極めて重要であると着想した。

さらに興味深いことに、アルツハイマー病やうつ病において FKBP51 が高発現し、病態と密接に関連することが報告されている。超高齢化社会を迎えた現代、FKBP51 が関与するがん、神経変性疾患、精神障害の克服は人類の喫緊の課題である。本研究は、基質タンパクの同定、その成果に基づいた FKBP によるがん増殖制御の分子メカニズムの解明し、プロリン異性化酵素を標的とする阻害薬を創出することを目指す。

2. 研究の目的

タンパク質の構造はその機能に極めて重要である。ペプチジルプロリルイソメラーゼ (PPIase) は、タンパク質中のプロリンのシス-トランス異性化反応を触媒し、タンパク質の高次構造を変化させる。FKBP は細胞増殖、転写など重要な生命現象に関与することが知られているが、詳細な機能はほとんど判明していない。その原因は PPIase が標的とする基質同定の困難さであると推測される。そこで本研究は、FKBP51 および FKBP52 の基質を同定し、プロリンの異性化が司る細胞増殖の機能に関する生命現象を解き明かすことを目的とする。

これまで研究代表者は、乳がんの新規治療標的因子として FKBP52 を同定した。本研究では FKBP52 および相同因子 FKBP51 の基質を同定し、乳がん細胞における役割を明らかにすることである。PPIase はがんだけでなく、神経変性疾患、精神障害との関連も報告されている。本研究成果は、中枢神経性疾患領域の病態解明の道を開拓できる可能性があり、ヒト医学に対する波及効果は極めて大きいと期待できる。

3. 研究の方法

相互作用する因子を同定し、基質としての可能性を検証する

FLAG-FKBP52を細胞に発現・免疫沈降し、網羅的に取得した結合タンパク質の中で、細胞増殖に関与する重要な因子に絞り込む。タンパク質構造データベースPDBを用いて、構造上重要な部位に存在するプロリンについて、合成ペプチド系を用いたin vitroのアッセイを行い、基質となる可能性を検証する。

プロリン異性化酵素の活性測定方法の確立

異性化候補のペプチド (C末端: 標的的P、F、ペプチジル-パラニトロアニリン, pNA) を合成する。FKBP活性によりプロリンがトランス体となると、キモトリプシンが選択的にフェニルアラニンを切断する。その速度は、遊離されるpNA由来の吸光度 (390 nm) 変化を観察することで測定する。ポジティブコントロールとしてFKBP51の基質であることが分かっているCdk4を用いる。

プロリン異性化の重要性解明

FKBP によって異性化される部位をアラニンに置換し異性化できない変異体を作製しその表現型を解析することで異性化の重要性を明らかにする。異性化部位変異体と野生型に対して結合する因子を網羅的に同定し、異性化の意義を検証する。

4. 研究成果

FKBP52、FKBP51 と結合するタンパク質を同定しその中で、細胞増殖に關与する重要な因子であり、かつユビキチンリガーゼに絞込み込んで解析を進めた結果、FKBP52 と結合する因子として BRCA1 を取得した。詳細な解析により、FKBP52 は BRCA1 と結合し、エストロゲン受容体(ER)の安定性を増加させていることが明らかとなった。ヒトに存在する FKBP ファミリー16 因子の中で FKBP52 と最も相同性の高い FKBP51 の機能を調べたところ、FKBP51 は ER の分解を促進することが分かった。重要なことに、ER 陽性乳がん患者さんにおいて FKBP52 が高発現していると、予後不良となることを見出した。逆に FKBP51 が高発現すると予後良好であることもわかった。FKBP52 の酵素活性が ER の安定性に重要であるかを検証するために、FKBP52 野生型を高発現すると、ER の発現は増加するが、酵素活性変異体を高発現しても ER の発現は増加しなかったことから、FKBP52 の異性化酵素活性が ER の安定化に寄与していると考えられた。さらに FKBP52 と結合する因子の中で基質となる候補因子について、in vitro プロリン異性化酵素アッセイ系を樹立し、基質であることを明らかにした。まず異性化候補のペプチドを合成し、PPIase の活性によってプロリンがトランス体に変化すると、キモトリプシンが選択的にフェニルアラニンを切断し、pNA が溶液中に遊離される。その pNA 由来の吸光度 (390 nm) の変化を測定することで、異性化酵素活性を測定できるアッセイ系を構築した。さらに、同定した基質の異性化部位に対して異性化変異体を作製し、野生型と変異体に FLAG タグを付けて 293T 細胞で過剰発現させた。そして、FLAG-pull down とプロテオミクス解析により、結合する因子を包括的に特定した。異性化部位変異体と野生型との間で結合が変動する因子が 50 以上取得され、免疫沈降により結合状態の変化を詳細に検討した。その中で、異性化部位変異体において結合が増加または減少する因子として DNA 修復酵素に着目した。野生型と異性化部位変異体との比較で、DNA 修復酵素の結合が異性化部位変異体では大幅に減少することが明らかになった。この結果から、異性化を介した DNA 修復の活性調節が行われている可能性が示唆された。

FKBP51 については FKBP51 酵素活性特異的阻害剤で前立腺がん細胞を処理すると増殖が顕著に阻害されることから、FKBP51 の酵素活性ががん細胞の増殖に必須であることがわかった。FKBP51 発現抑制細胞においては AR (アンドロゲン受容体) の二量体化が減少したことから、FKBP51 が AR のプロリンを異性化する可能性が示唆された。そこで AR-Pro767 が FKBP51 により異性化され二量体形成に重要である可能性を考え検証した結果、AR-Pro767A 変異体は二量体形成効率が減少することがわかった。リガンド結合に伴う AR-Hsp90-FKBP 複合体の会合を調べるため、NanoBiT アッセイを用いてこれらの相互作用のダイナミクスを調べた。その結果、AR と Hsp90、AR と FKBP の結合は DHT 添加後、解離することがわかった。AR-Hsp90-FKBP 複合体からの AR の解離により、AR の核内移行、二量体形成、プロモーター配列に対する DNA 結合ドメインの認識などのイベントが引き起こされると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Habara Makoto, Sato Yuki, Goshima Takahiro, Sakurai Masashi, Imai Hiroyuki, Shimizu Hideyuki, Katayama Yuta, Hanaki Shunsuke, Masaki Takahiro, Morimoto Masahiro, Nishikawa Sayaka, Toyama Tatsuya, Shimada Midori	4. 巻 119
2. 論文標題 FKBP52 and FKBP51 differentially regulate the stability of estrogen receptor in breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2110256119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2110256119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Takahiro, Shimada Midori	4. 巻 23
2. 論文標題 Decoding the Phosphatase Code: Regulation of Cell Proliferation by Calcineurin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1122 ~ 1122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Takahiro, Habara Makoto, Sato Yuki, Goshima Takahiro, Maeda Keisuke, Hanaki Shunsuke, Shimada Midori	4. 巻 118
2. 論文標題 Calcineurin regulates the stability and activity of estrogen receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2114258118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2114258118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Keisuke, Habara Makoto, Kawaguchi Mitsuyasu, Matsumoto Hiroaki, Hanaki Shunsuke, Masaki Takahiro, Sato Yuki, Matsuyama Hideyasu, Kunieda Kazuki, Nakagawa Hidehiko, Shimada Midori	4. 巻 16
2. 論文標題 FKBP51 and FKBP52 regulate androgen receptor dimerization and proliferation in prostate cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 940 ~ 956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.13030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hanaki Shunsuke, Habara Makoto, Masaki Takahiro, Maeda Keisuke, Sato Yuki, Nakanishi Makoto, Shimada Midori	4. 巻 112
2. 論文標題 PP1 regulatory subunit NIPP1 regulates transcription of E2F1 target genes following DNA damage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2739 ~ 2752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hanaki Shunsuke, Habara Makoto, Shimada Midori	4. 巻 26
2. 論文標題 UV induced activation of ATR is mediated by UHRF2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 447 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mikawa Takumi, Shibata Eri, Shimada Midori, Ito Ken, Ito Tomiko, Kanda Hiroaki, Takubo Keiyo, Lleonart Matilde E., Inagaki Nobuya, Yokode Masayuki, Kondoh Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Phosphoglycerate Mutase Cooperates with Chk1 Kinase to Regulate Glycolysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101306 ~ 101306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hanaki Shunsuke, Shimada Midori	4. 巻 -
2. 論文標題 Targeting EZH2 as cancer therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前田 啓介、羽原 誠、松本 洋明、花木 駿介、正木 貴大、佐藤 悠紀、島田 緑
2. 発表標題 プロリン異性化酵素によるアンドロゲン受容体機能調節メカニズムの解明
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 正木 貴大、羽原 誠、佐藤 悠紀、前田 啓介、花木 駿介、島田 緑
2. 発表標題 カルシウムシグナル伝達経路によるがん細胞の増殖制御機構
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花木 駿介、羽原 誠、正木 貴大、前田 啓介、佐藤 悠紀、島田 緑
2. 発表標題 PP1脱リン酸化酵素を介した転写調節機構の解明
3. 学会等名 第10回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 羽原 誠、正木 貴大、佐藤 悠紀、前田 啓介、花木 駿介、島田 緑
2. 発表標題 カルシニューリンはエストロゲン受容体 の安定性および活性を制御する
3. 学会等名 第10回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hanaki S, Habara S, Masaki T, Maeda K, Sato Y, Shimada M
2. 発表標題 DNA damage induces downregulation of E2F1 target genes by the dissociation of PP1 and its regulatory subunit NIPP1
3. 学会等名 The 6th International Symposium Association of Japan-Indonesia Veterinary Education 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花木駿介、羽原誠、正木貴大、前田啓介、佐藤悠紀、中西真、島田緑
2. 発表標題 PP1脱リン酸化酵素を介した転写抑制機構
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花木駿介、正木貴弘、前田啓介、佐藤悠紀、羽原誠、中西真、島田緑
2. 発表標題 PP1脱リン酸化酵素を介した転写抑制機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 羽原誠、五島隆宏、正木貴大、前田啓介、花木駿介、佐藤悠紀、加藤洋一、島田緑
2. 発表標題 乳がんの予後不良因子サイクリンD1の発現調節機構の解明
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田緑
2. 発表標題 カルシニューリンによる細胞増殖制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田緑
2. 発表標題 PP1とNIPP1の相互作用を介したDNA損傷後のE2F1標的遺伝子の転写抑制機構
3. 学会等名 第63回大会日本放射線影響学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 正木貴大、羽原誠、花木駿介、前田啓介、佐藤悠紀、島田緑
2. 発表標題 カルシニューリンはエストロゲン受容体 の安定性と活性を制御する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田緑
2. 発表標題 A Day in the Life
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会サテライトシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スペイン	Hospital Vall de Hebron			