

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12738

研究課題名(和文) 配位金属制御に基づく新規な基質トラッピング法による癌抑制ホスファターゼ標的の探索

研究課題名(英文) Development of a new method for identifying substrates of PPM1 phosphatase family

研究代表者

坂口 和靖 (Sakaguchi, Kazuyasu)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：00315053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は、細胞の恒常性を保つための主要なタンパク質制御機構である。タンパク質脱リン酸化酵素であるPPM1ファミリーは、12種類のアイソフォームから構成され、細胞分化、細胞周期調節、アポトーシス、さらには代謝系など極めて多様な生命現象に関与することが示されており、非常に注目されている。しかしながら、現在まで多くのPPM1ファミリーに対する細胞内標的や特異的基質配列を見出す一般的な方法はなく、その開発が急務となっている。本研究では、特異的基質配列および細胞内標的を同定する新規な手法「配位金属制御に基づく基質トラッピング法」を考案し、その有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：Protein Phosphorylation and dephosphorylation is a key mechanism for regulation of protein functions. Human PPM1 phosphatase family is composed of 12 members that play important roles in wide variety of cellular responses, such as differentiation, cell cycle regulation, and metabolism. However, there is not a versatile method to find cellular targets and substrates for these phosphatases. In this study, we designed a new method for identifying substrates and demonstrated that this method is very effective.

研究分野：生物化学

キーワード：酵素 脱リン酸化 プロテインホスファターゼ 基質

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内においてタンパク質は様々な翻訳後修飾によって活性が調節され、中でもプロテインキナーゼによるリン酸化とプロテインホスファターゼによる脱リン酸化は、シグナル伝達経路において中心的な役割を果たしている。最近の研究において、プロテインホスファターゼの能動的なシグナル伝達経路制御が明らかになってきた。脱リン酸化の異常が癌やアルツハイマー病を含む多様な疾患に深く関与していることから、プロテインホスファターゼによるシグナル伝達制御機構解明の重要性がますます高くなっている。

PPM1 ファミリーは、二価金属イオン依存性のセリン/スレオニンホスファターゼであり、ヒトでは 12 種類のアイソフォームから構成される (図 1)。PPM1 ホスファターゼは、細胞分化、細胞周期調節、アポトーシス、さらには代謝系など極めて多様な生命現象に関与することが示されている。また、PPM1 ファミリーの遺伝子およびタンパク質の異常が、発癌、低血圧症およびシスチン尿症など様々な疾患を引き起こすことが明らかとなっている。たとえば、ILKAP (Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C) は、足場非依存的な細胞増殖を抑制し、癌抑制タンパク質として機能することが示されている。ILKAP ホスファターゼは 392 アミノ酸残基よりなり、N 端領域、PPM1 触媒ドメイン、およびインサート領域から構成されている。また、我々は、PPM1 ファミリーホスファターゼの構造および機能の制御機構の解明に関する研究を展開し、分子レベルで解明している。現在までに、新規癌ホスファターゼ PPM1D の同定、そのペプチド性および小分子阻害剤の開発を実施し、さらに新規ホスファターゼ活性測定系の開発、新規スプライシングバリエーションの同定を実施している。

今日までホスファターゼの基質同定は、主に分子生物学的手法により行われている。しかしながら、ホスファターゼに対する細胞内標的タンパク質およびその脱リン酸化部位の同定は、キナーゼによりリン酸化された部

位の脱リン酸化解析が必要なため非常に難しい。特に、PPM1 ファミリーに対する細胞内標的や特異的基質配列を見出す一般的な手法はなく、PPM1 ホスファターゼ研究の大きな障害となっており、その手法開発が急務となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、癌抑制タンパク質の候補とされている ILKAP を含む PPM1 ホスファターゼファミリーに対する汎用的な細胞内標的および特異的基質配列の同定のための新規手法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ホスファターゼの調製: His-PPM1S, GST-PPM1A および His-ILKAP ホスファターゼを大腸菌発現系によって調整し、GST-tag アフィニティー精製、陰イオン交換精製、ゲルろ過精製の 3 段階の精製により、高純度・高活性で調整した。

(2) ペプチドの合成: リン酸化ペプチドを含むすべてのペプチドは、Fmoc 固相合成法により化学合成し、HPLC で精製後、MALDI-Tof mass により確認した。

(3) *in vitro* ホスファターゼ活性: ホスファターゼ活性は、50 mM Tris-HCl, pH 7.5 溶液中で行い、BIOMOL GREEN Reagent により測定した。

(4) トラッピング実験: 二価金属イオン存在下において、GST-PPM1A をペプチドの混合溶液 (200 nM GST-PPM1A, ペプチド各 2 μM, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 M EGTA, 0.02% 2-mercaptethanol, 50 mM NaCl) をグルタチオンビーズと 4°C において 1 時間インキュベートした後、buffer および milliQ で washing を行い、10% 酢酸 で溶出した。溶出した sample は、MALDI-Tof mass によって解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 基質同定法のデザイン

ILKAP を含む PPM1 ファミリーホスファターゼの細胞内標的および特異的基質配列を同定するために、新規基質同定法を考案した。

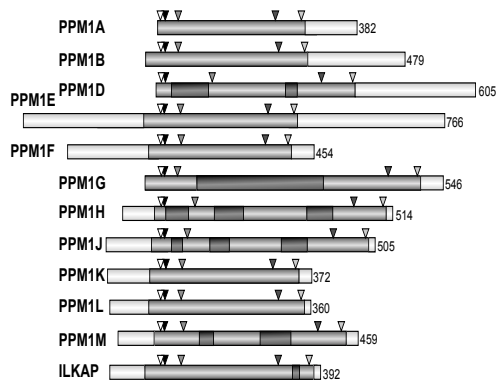


図1 ヒト PPM1 ファミリーホスファターゼ

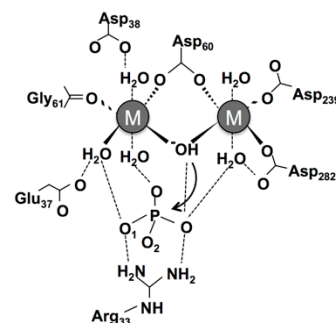


図2 PPM1 ホスファターゼの触媒機構

PPM1 ファミリーホスファターゼは、その活性にマンガンあるいはマグネシウムの二価金属イオンが必要である (図2)。我々は、PPM1 ホスファターゼの活性中心の二価金属イオンを亜鉛イオンなどに置換することにより、酵素活性は示さないが、基質との相互作用は維持する状態を作ることができると考え、二価金属イオン依存的サブストレートトラッピング法 (Metal-Dependent Substrate Trapping 法) を発案した (図3)。

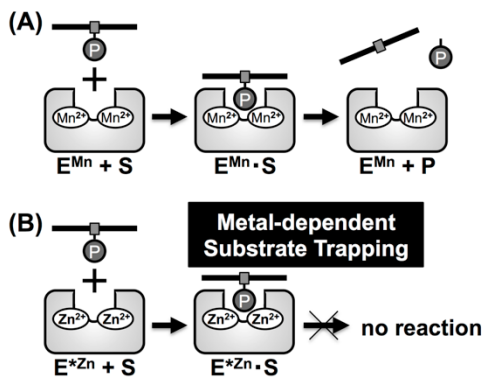


図3 金属イオン依存的サブストレートトラッピングの原理  
 (A)活性型 (B)亜鉛イオン型 (不活性)

図4に、二価金属イオン依存的サブストレートトラッピング法の概要を示す。①リン酸化ペプチドライブラリーあるいはリン酸化タンパク質混合物と Zn<sup>2+</sup>などの二価金属イオンチャージしたホスファターゼ ([M<sup>2+</sup>]-PPM1) をインキュベートし、②基質-[M<sup>2+</sup>]-PPM1 複合体を形成させる。③アフィニティーカラムにより、基質-[M<sup>2+</sup>]-PPM1 複合体を精製し、④同定する。

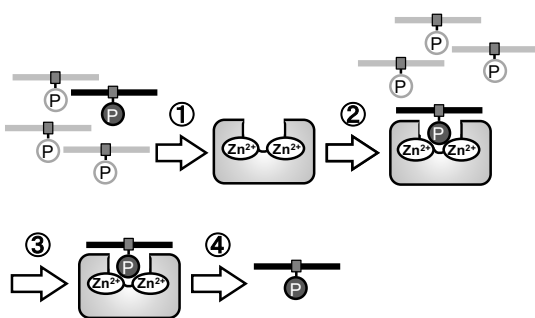


図4 金属イオン依存的サブストレートトラッピング法の概要

(2) 各種二価金属イオン存在下でのホスファターゼ活性

亜鉛、マンガンあるいはマグネシウムの二価金属イオン存在下において、CaMKII (287pT) を基質ペプチドとして用いて ILKAP および PPM1A のホスファターゼ活性を測定した。その結果、マンガン、マグネシウムイオン

存在下ではホスファターゼ活性を示した一方、亜鉛イオン存在下では ILKAP および PPM1A ともに不活性であった (図5)。これにより、亜鉛イオンによっては、PPM1 ファミリーの活性化が起きないことが示された。

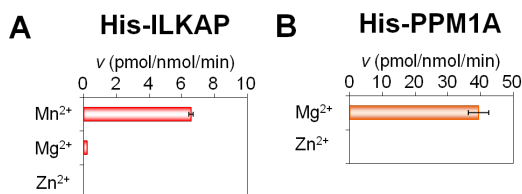


図5 二価金属イオンの PPM1 活性への効果

(3) PPM1A を用いた二価金属イオン依存的サブストレートトラッピング

細胞内基質やペプチド基質が既知である PPM1A をモデルホスファターゼとして用いて、二価金属イオン依存的サブストレートトラッピングを実施した。亜鉛イオン存在下における、PPM1A 基質リン酸化ペプチド 4 種 [CaMKII (278pS), CaMKII (278pT), p53 (20pS), p53 (20pT)] と非基質リン酸化ペプチド 4 種 [p53 (15pS), p53 (315pS), p53 (378pS), p53 (392pS)] に対する結果を、図6に示す。

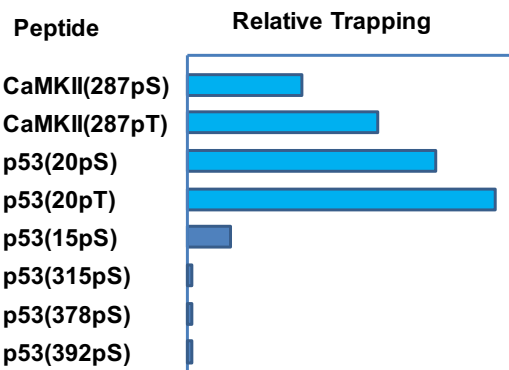


図6 PPM1A に対するトラッピング

図6に示すように、基質リン酸化ペプチドは亜鉛イオン存在下で、PPM1A と脱リン酸化されることなく相互作用し、トラッピングされていることが明らかとなった。一方、非基質リン酸化ペプチドは、ほとんどトラッピングされなかった。また、カルシウムイオン存在下あるいは二価金属イオンが存在しない場合、p53 (20pS) はトラッピングされなかった。この結果より、トラッピングは亜鉛イオン特異的であることが示された (図7)。

以上の結果より、亜鉛イオン依存的サブストレートトラッピング法の有効性が示された。

ところで、興味深いことに本トラッピングにおいて、亜鉛イオン存在下で脱リン酸化ペプチド p53 (20S) も PPM1A と相互作用することが示された。しかしながら、PPM1A と p53 (20S) との相互作用は、カルシウムイオン存在下あ

るいは二価金属イオン非存在下においても見られた。このことより、p53(20S)は酵素生産物阻害をしていることが考えられ、PPM1Aが生産物によるフィードバック阻害機構によって制御されることが示唆された。

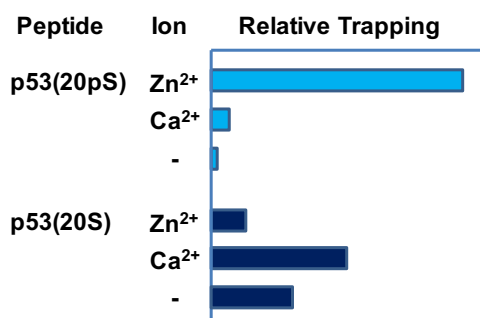


図7 PPM1Aトラッピングのイオン依存性

本研究によって、PPM1ファミリーホスファターゼの細胞内標的および特異的基質配列の同定法として、二価金属イオン依存的サブストレートトラッピング (Metal-Dependent Substrate Trapping) が有効であることが明らかに示された。今後は、より特異的かつ高効率なトラッピングのために、結合、溶出の最適化を実施する。

今後、二価金属イオン依存的サブストレートトラッピング法により PPM1ファミリーホスファターゼの機能解明が進むことが強く期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. 小笠原 紗里、鎌田 瑠泉、坂口 和靖、癌原遺伝子産物プロテインホスファターゼによる細胞癌化機構と阻害剤開発, 化学工業, 67, 781-786, (2016), 査読無
2. 鎌田 瑠泉、中馬 吉郎、小境 夕紀、坂口 和靖, がん原遺伝子産物 PPM1D の細胞がん化機構および創薬を指向した阻害剤, 生化学, 87, 531-538, (2015), 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 白幡祐貴子、清田雄平、松山祐昂、西村裕一、中馬吉郎、下東康幸、坂口和靖, 多様なシグナル経路に關与する PPM1A ホスファターゼの脱リン酸化部位認識機構, 日本化学会秋季事業第 6 回 CSJ フェスタ 2016, 2016/11/14, タワーホール船堀(東京都江戸川区)
2. K. Sakaguchi, Regulation of adipocyte differentiation and lipid droplet formation by PPM1D phosphatase, 第 12 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2016/10/27-30, 近畿大学東大阪キャンパス(大阪府・東大阪市) 招待講演
3. 白幡祐貴子、清田雄平、松山祐昂、鎌田瑠泉、下東康幸、坂口和靖, Ser/Thr ホスファターゼ PPM1A (PP2C-a) の脱リン酸化部位認

識機構, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/9/25-27, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

4. K. Sakaguchi, p53-inducible phosphatase PPM1D: Function, regulation and inhibitor development, 16th Akabori Conference, 2016/5/23-26, 六甲山ホテル(兵庫県・神戸市) 招待講演
5. 鎌田瑠泉、木村望、小笠原紗里、工藤風樹、清田雄平、坂口和靖, Ser/Thr ホスファターゼ PPM1A (PP2C-a) の脱リン酸化部位認識機構, 第 7 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会, 2016/1/29, 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市) 招待講演
6. 塚原七星、清田雄平、白幡祐貴子、鎌田瑠泉、坂口和靖, リン脂質の PPM1 ホスファターゼ ILKAP 脱リン酸化活性に対する効果, 第 7 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会, 2016/1/29, 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市)
7. K. Sakaguchi, Tetramerization Domain of Tumor Suppressor Protein p53: Evolution, Mutation and Application, The 7th International Peptide Symposium, 2015/12/9, Park Avenue Rochester Hotel (Biopolis, Singapore) 招待講演
8. 坂口和靖, Oncogenic phosphatase PPM1D: Role in carcinogenesis and its inhibitors, 2015/12/4, 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)
9. 塚原七星、清田雄平、白幡祐貴子、鎌田瑠泉、坂口和靖, PPM1 ホスファターゼ ILKAP の脱リン酸化能に対するリン脂質の効果, 日本化学会秋季事業第 5 回 CSJ フェスタ 2015, 2015/10/15, タワーホール船堀(東京都江戸川区)
10. 工藤風樹、鎌田瑠泉、吉村文彦、谷野圭持、坂口和靖, PPM1D ホスファターゼ阻害剤の急性骨髄性白血病細胞株 HL-60 分化に対する効果, 日本生化学会第 52 回北海道支部例会, 2015/7/17, 北海道大学(北海道・札幌市)

[その他]

ホームページ等

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~biochem/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

坂口 和靖 (SAKAGUCHI KAZUYASU)  
北海道大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号: 00315053