

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06545

研究課題名(和文) セリン・スレオニン脱リン酸化酵素PP6の「個体レベルでの生理機能の解明」

研究課題名(英文) Elucidation of physiological functions of serine threonine phosphatase PP6

研究代表者

渡邊 利雄 (Watanabe, Toshio)

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：60201208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：セリン・スレオニン脱リン酸化酵素PP6の以下の新しい機能が判明した。(1) 胚の正常発生に必須。(2) PP6はオートファジー活性に重要なP62に依存したオートファジーにより分解制御される。(3) MEF細胞では、従来の個体レベルの結果とは異なり、活性化型K-Ras発現の有無によらず、PP6は細胞の増殖・造腫瘍形成に必要である。(4) PP6の神経細胞特異的欠損は誕生後2日以内の死亡を引き起こした。胎生18.5日目の脳では大脳新皮質第Ⅴ層の神経細胞数の減少が認められたが、大脳新皮質第Ⅵ層神経の増殖の異常は認められない。大脳新皮質第Ⅰ層部分に存在する介在神経の細胞数の減少が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セリン・スレオニン脱リン酸化酵素PP6の機能として、細胞レベルでオートファジーとの関わりを、恒常活性化型K-Rasとの関係が個体レベルでの結果と異なることを明らかにし、新たなPP6研究の領域を創出した。加えて、PP6が造血細胞発生や神経系の細胞の機能に重要な働きをしていることを組織特異的な欠損体で明らかにした。今後のPP6の生理機能解析の基礎となった。癌の治療や各組織の形成時にPP6が重要であることは、今後のがん治療薬の開発や再生医療の基礎として価値がある成果となることが期待でき、社会的にも意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：The following new functions of serine/threonine phosphatase PP6 have been identified. (1) PP6 is essential for normal embryonic development. (2) PP6 degradation is regulated by autophagy dependent on P62, which is important for autophagy activity. (3) In MEF cells, PP6 is required for cell proliferation and tumorigenesis regardless of the presence or absence of activated K-Ras expression, in contrast to previous results at the individual level. (4) Neuronal-specific loss of PP6 caused death within 2 days after birth. (5) The 18.5-day-old brain showed a decrease in the number of neurons in layers V and VI of the neocortex, but no abnormality in the proliferation of layer V nerves of the neocortex. A decrease in the number of cells of interneurons in the layer I portion of the neocortex was observed.

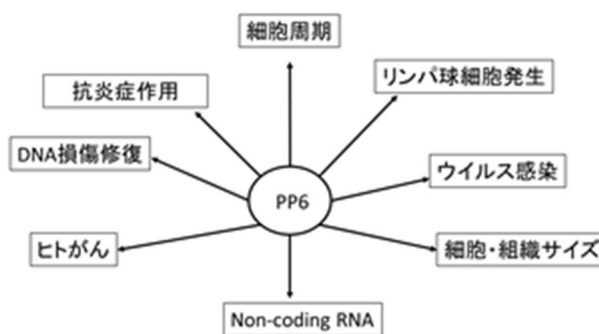
研究分野：分子細胞生物学

キーワード：脱リン酸化酵素PP6 恒常活性化型K-Ras オートファジー 胎児肝臓造血 神経細胞分化

1. 研究開始当初の背景

PP6 はセリン・スレオニン脱リン酸化酵素で、触媒サブユニットの Ppp6c、調節サブユニットの ARS (ankyrin-repeat subunit) と SAPS (Sit4p-associated proteins subunit) の 3 つのサブユニットから成り立っている。PP6 の触媒サブユニットをコードしている Ppp6c 遺伝子は、酵母からヒトに至るまで広く保存されている。PP6 は全身の組織で発現しており、研究に多用されている HeLa 細胞では最も多量に存在するセリン・スレオニン脱リン酸化酵素である (Mol Syst Biol, 2011)。

右の図に示すように、これまで酵母や線虫での機能解析により、Ppp6c は細胞周期のチェックポイントに働いていることが報告されている (Cell, 2009)。また、ほ乳類培養細胞を用いた研究より、Ppp6c はウイルス感染応答 (Mol Cell, 2017) や、細胞のサイズの決定 (Cell Rep., 2018) に加え、DNA 修復、染色体分離、NF- κ B シ



PP6は多彩な機能を果たしているらしい

グナル制御などがんの要因に関連することが示唆されている。これらの報告は培養細胞(主にがん細胞株の HeLa 細胞など)レベルでの siRNA によるノックダウンの実験である (FEBS J, 2013)。個体レベルでの生理機能も徐々に解明されている。欠損マウスが胚性致死であることは我々が発見した (Ogoh et al., Mech of Dev., 139, 1-9, 2016)。組織特異的な欠損から、PP6 が T 細胞発生の負の制御因子として働くことや、卵子の第一減数分裂前期で機能していることが報告されている (J. I., 2015; PLoS Genet, 2016)。

2. 研究の目的

本申請研究の最終目的は、セリン・スレオニン脱リン酸化酵素 PP6 の「個体レベルでの生理機能の解明」である。そのために、PP6 の触媒サブユニット Ppp6c の組織特異的欠損マウスと誘導型 Ppp6c 欠損 MEF 細胞とを用いて、以下の 3 つの「学問的問い」を解明することを目的とした。(1) 血液・血管系での組織特異的 Ppp6c 欠損により欠損効果を検証し、血液・血管系における PP6 の生理機能を解明する。(2) bafilomycin A 添加により誘導されるオートファジーが Ppp6c 欠損時に増強されることから、PP6 とオートファジー誘導との関係の分子メカニズムを解明する。(3) がん細胞の腫瘍形成時には増殖促進、正常細胞時には増殖抑制と Ppp6c 欠損効果が真逆になるパラドックスを検証するため、活性化型 K-Ras の誘導発現系を導入した誘導型 Ppp6c 欠損 MEF 細胞を用いて、in vitro, in vivo で PP6 の生理機能を解明する。

3. 研究の方法

セリン・スレオニン脱リン酸化酵素 PP6 の「個体レベルでの生理機能の解明」という申請研究の

目的を達成するために、組織特異的 Ppp6c 欠損マウスとタモキシフェン誘導型 Ppp6c 欠損 MEF 細胞とを用いて、研究機期間内に以下の3つの「問い」を明らかにする。

(1) 血液特異的 Ppp6c 欠損効果を解明するために、ア) 胎児肝臓中の「血球細胞画分」の動態変化を、表面マーカーを指標に FACS にて解析する、イ) 胎児肝臓中の「造血幹細胞画分」の血球分化能を幹細胞移植にて詳細に検討する、ウ) 胎児造血時に加えて、成体骨髄での造血時の PP6 の生理機能を検討するために、血液特異的欠損誘導型 Ppp6c マウスを造血幹細胞移植にて作出する。(2) PP6 とオートファジーとの関係を解明する: bafilomycin A 添加により誘導されるオートファジーが Ppp6c 欠損で増強された。ア) まずは Beclin と Ppp6c との関係を検討する。イ) オートファジーが Ppp6c を抑制する機構が存在するのかを検討する。

(3) 腫瘍形成時には増殖促進、正常細胞時には増殖抑制と Ppp6c 欠損効果が真逆になるパラドックスを検証・解明する: 作製済みの MEF 細胞を用いて通常の単層培養時とマウスへの移植を行い、活性化型 K-Ras の発現への Ppp6c 欠損の細胞増殖への効果を明らかにする。シグナル伝達機構が良く解析されている MAP キナーゼ・カスケードに関しても Ppp6c 欠損による変化の有無を同様に検討する。

4. 研究成果

以下に示す、当初の計画に沿った結果と、当初の計画から広がる形での成果とを挙げることに成功した。

(1) 造血系(幹細胞)における PP6 の生理機能解析を行った。Tie2-Cre での欠損効率が予想外に低いことが判明した。そこで、現在欠損が誘導された細胞のみを回収できるように Cre により YFP 発現が同時に誘導できるマウスを作製中である。また、成体での解析かつ高効率の欠損誘導を期待して、Ppp6c (floxed/floxed); ERT2-Cre マウスの造血細胞画分を移植して、造血系でのみ欠損を誘導できる移植マウスの樹立に成功した。しかしタモキシフェンの添加により Cre 依存的欠損を誘導したところ、タモキシフェンにより誘導される効果なのか造血の亢進効果が大きく出て、Ppp6c 欠損の効果が解析できたとは判断できなかった。コロナ感染拡大により、大学間の交流ができなくなり、その後の移植実験と解析とは実施できていないのは、正直痛かった。

(2) PP6 はオートファジー活性に重要な P62 に依存したオートファジーにより分解制御されていることを示し、がん細胞での PP6 タンパク質の蓄積は、部分的にはあるがオートファジーの欠損による可能性があることを示すことに成功した。この成果は Cancer Science 111:4371-4380, 2020. として論文公表した。

(3) Ppp6c 欠損 MEF 細胞は、活性化型 K-Ras 発現があれば増殖・維持でき、活性化型 K-Ras 発現が無ければ増殖・維持できないことを見出した。コロニー形成能で解析すると、活性化型 K-Ras 発現 Ppp6c 欠損 MEF 細胞は Ppp6c 非欠損細胞の 60%程度のコロニー形成能を示し、既報とは異なり活性化型 K-Ras 発現でも実は十分には機能相補できないことを見出した。さらに詳しく解析するために誘導欠損ができる MEF 細胞を樹立し、これを用いて MEF 細胞での増殖と造腫瘍に対する Ppp6c の欠損効果を検討した。個体レベルの結果とは異なり、少なくとも MEF 細胞では、

活性化型 K-Ras 発現があったとしても、平板培養や軟寒天培地でのコロニー形成は Ppp6c 欠損により大幅に減少し、さらに同系マウスへの移植による腫瘍形成能も大幅に低下した。MEF 細胞では、従来の個体レベルの結果とは異なり、活性化型 K-Ras 発現の有無によらず、PP6 は細胞の増殖・造腫瘍形成に必要であることを初めて明らかにした。

(4) リン酸化反応が重要な神経系と脂肪細胞系での PP6 の機能を探るため、Nestin-Cre (神経幹細胞で欠損、神経系全般) で欠損させると、全例誕生後 2 日以内に死亡するが脳の全体号増としての変化は見られなかった。一方胎生 18.5 日目の脳では大脳新皮質第 1 層の神経細胞数の減少が認められた。このことから、神経幹細胞特異的 KO マウスでは大脳新皮質下層神経において、細胞の増殖や移動の異常などの発生異常が生じていることが示唆された。しかし、大脳新皮質第 1 層神経の増殖に関する異常は認められなかった。他にも、神経幹細胞特異的 KO マウスでは大脳新皮質第 1 層部分に存在する介在神経の細胞数の減少が認められた。このことから、神経幹細胞特異的 KO マウスでは介在神経においても発生異常が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Mami Sumiyoshi, Yui Kotani, Yuki Ikuta, Kazutomo Suzue, Madoka Ozawa, Tomoya Katakai, Taketo Yamada, Yasunori Kanaho, Toshio Watanabe, and Satoshi Matsuda	4. 巻 206
2. 論文標題 Arf1 and Arf6 synergistically maintain survival of T cells during activation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Immunology	6. 最初と最後の頁 366-375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000971	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 Kanazawa, Kosuke; Kishimoto, Kazuhiro; Nomura, Miyuki; Kurosawa, Koreyuki; Kato, Hiroyuki; Inoue, Yui; Miura, Koh; Fukui, Katsuya; Yamashita, Yoji; Sato, Ikuro; Tsuji, Hiroyuki; Watanabe, Toshio; Tanaka, Takuji; Yasuda, Jun; Tanuma, Nobuhiro; Shima, Hiroshi	4. 巻 112
2. 論文標題 Ppp6c haploinsufficiency accelerates UV-induced BRAF(V600E)-initiated melanomagenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2233-2244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14895	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 K Kishimoto, K Kanazawa, N Tanuma, T Tanaka, M Nomura, T Shigemoto-Kuroda, Katsuya Fukui, Koreyuki Kurosawa, Hiroyuki Kato, Keiko Terasaki, Yoshimi Sakamoto, Yoji Yamashita, Ikuro Sato, Koh Miura, Keiichi Tamai, Issay Kitabayashi, Kazuto Matsuura, Toshio Watanabe, Jun Yasuda, Hiroyuki Tsuji, Hiroshi Shima	4. 巻 10
2. 論文標題 Ppp6c deficiency accelerates K-rasG12D-induced tongue tumorigenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 4451-4464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3962	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 Katsuya Fukui, Miyuki Nomura, Kazuhiro Kishimoto, Nobuhiro Tanuma, Koreyuki Kurosawa, Kosuke Kanazawa, Hiroyuki Kato, Tomoki Sato, Shinji Miura, Koh Miura, Ikuro Sato, Hiroyuki Tsuji, Yoji Yamashita, Keiichi Tamai, Toshio Watanabe, Jun Yasuda, Takuji Tanaka, Kennichi Satoh, Toru Furukawa, Keiichi Jingu, Hiroshi Shima	4. 巻 113
2. 論文標題 PP6 deficiency in mice with KRAS mutation and Trp53 loss promotes early death by PDAC with cachexia-like features	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1613-1624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15315	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 Kunie Ando, Robert De Decker, Cristina Vergara, Zehra Yilmaz, Salwa Mansor, Valerie Suain, Kristel Slegers, Marie-Claude Potier, Charles Duyckaerts, Toshio Watanabe, Luc Buee, Karelle Leroy, Jean-Pierre Brion and the Brainbank Neuro-CEB Neuropathology Network.	4. 巻 139
2. 論文標題 Picalm reduction exacerbates tau pathology in a murine tauopathy model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica	6. 最初と最後の頁 773-789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00401-020-02125-x.	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 Shinya Rai, Hirokazu Tanaka*, Mai Suzuki, J. Luis Espinoza, Takahiro Kumode, Akira Tanimura, Yasuyoshi Morita, Yoichi Tatsumi, Takafumi Yokota, Kenji Oritani, Toshio Watanabe, Yuzuru Kanakura, and Itaru Matsumura.	4. 巻 11
2. 論文標題 Chlorpromazine eliminates acute myeloid leukemia cells by perturbing subcellular localization of FLT3-ITD and KIT-D816V.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17666-8	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 Nobuyuki Fujiwara, Shusaku Shibutani, Yusuke Sakai, Toshio Watanabe, Issei Kitabayashi, Hiroko Oshima, Masanobu Oshima, Hisashi Hoshida, Rinji Akada, Tatsuya Usui, Takashi Ohama*, Koichi Sato.	4. 巻 111
2. 論文標題 Autophagy regulates levels of tumor suppressor enzyme protein phosphatase 6.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4371-4380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14662.	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松岡末樹、渡邊利雄
2. 発表標題 神経系における脱リン酸化酵素PP6の機能解析
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤 弘次, 長谷川 稜, 戸田 あかり, 堀 羽衣音, 渡邊 利雄, 太田 安隆
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質Arf1による膜ブレブの制御
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 樹、青木 清乃、山本 采佳、山野 莊太郎、大島 正伸、八尾 良司、渡邊 利雄、田中 知明、大木 理恵子
2. 発表標題 p53標的遺伝子p53PAD5は腸管上皮細胞にストレス抵抗性を付与する。
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷 唯、住吉 麻実、笹田 萌未、渡邊 利雄、松田 達志
2. 発表標題 肥満細胞における低分子量Gタンパク質Arf1の機能解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡 未樹、酒井 大輔、島 礼、渡邊 利雄
2. 発表標題 神経系における脱リン酸化酵素PP6の機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井 杏、吉岡 ゆきの、小柴 琢己、渡邊 利雄
2. 発表標題 Mul1欠損メスマウスが示す不妊の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉岡 ゆきの、中井 杏、小柴 琢己、渡邊 利雄
2. 発表標題 Mul1遺伝子欠損メスマウスにおける不妊の原因解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡 未樹、酒井大輔、島礼、渡邊利雄
2. 発表標題 神経系における脱リン酸化酵素PP6の機能解析
3. 学会等名 【2021年度先端モデル動物支援P】成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中井 杏、吉岡 ゆきの、安田 恵子、小柴 琢己、渡邊 利雄
2. 発表標題 Mul1欠損メスマウスが示す不妊の原因解析
3. 学会等名 【2021年度先端モデル動物支援P】成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天津 友貴、松尾 尚輝、山本 采佳、中寄 詩乃、小河 穂波、一戸 猛志、小柴 琢己、渡邊 利雄
2. 発表標題 ウイルス感染に対するMul1欠損細胞の応答解析 Analysis of how Mul1-KO MEFs response to virus infection.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉岡ゆきの、天津 友貴、山本 采佳、安田恵子、小柴 琢己、渡邊 利雄
2. 発表標題 Mul1遺伝子欠損マウスは不妊性を示す Mul1-deficient mice show infertility.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
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
---------	---------