

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2021～2023
課題番号：21K05310
研究課題名(和文) 低毒性がん転移抑制剤開発のための学際研究：アフィニティータグ法による阻害剤の創製

研究課題名(英文) Interdisciplinary Research for the Development of Cancer Metastasis Inhibitors with Low Toxicity: Development of Inhibitors by Affinity Tagging Method

研究代表者
石田 敦彦 (Ishida, Atsuhiko)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・教授

研究者番号：90212886
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが発見した新奇酵素CaMキナーゼホスファターゼ(CaMKP、別名PPM1F/POPX2)は最近の研究により、がん細胞の遊走・浸潤を制御する鍵酵素であることが明らかになってきた。申請者らが既に見いだしている本酵素の阻害剤は細胞毒性も低いので、副作用の少ないがん転移阻害剤になることが期待できる。そこで本研究計画では、CaMKP特異的基質の開発に利用した“アフィニティータグ法”を応用し、より高い阻害特異性を持つCaMKP阻害剤を開発し、培養乳がん細胞を用いたアッセイ系で、乳がん細胞の遊走・浸潤に及ぼす効果を検証することを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CaMKPを標的としたがん転移抑制剤の開発は全くはじめての試みである。従来の抗がん剤のようにがん細胞に対する選択毒性を持つものではなく、浸潤・遊走のみを抑制し且つ細胞毒性が低いものを創製しようとするのが本研究の特徴である。我が国で発見された新奇酵素CaMKPが新たな分子標的として注目されつつある現在、独自の生化学的視点に基礎をおいた有効な特異的阻害剤の開発は喫緊の課題であり、その特異的阻害剤の医学的応用に道を拓く意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：A novel enzyme CaM kinase phosphatase (CaMKP, also known as PPM1F/POPX2), discovered by the applicants, has been shown in recent studies to be a key enzyme that regulates cancer cell migration and invasion. Inhibitors of this enzyme, which the applicants have already discovered, have low cytotoxicity and are expected to become cancer metastasis inhibitors with fewer side effects. Therefore, in this research project, we aim to develop CaMKP inhibitors with higher inhibitory specificity by applying the "affinity tag method," which was used to develop CaMKP-specific substrates, and to examine their effects on breast cancer cell migration and invasion in an assay system using cultured breast cancer cells. The objective of this study was to verify the effect of CaMKP inhibitors on the migration and invasion of breast cancer cells by using cultured breast cancer cells.

研究分野：生化学、酵素化学

キーワード：プロテインホスファターゼ 阻害剤 細胞毒性 がん転移 有機合成

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CaMK ホスファターゼ (CaMKP) は、1998 年に我々の研究グループにより、CaM キナーゼ (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II) の自己リン酸化部位を脱リン酸化するセリン/スレオニンプロテインホスファターゼとして同定・精製された PPM (metal-dependent protein phosphatase) ファミリーホスファターゼである。その後、線虫の性決定に關与する遺伝子産物 FEM-2 のオルソログであることが報告され、さらに 2002 年にヒト CaMKP が POPX2 という名称で報告された。昨今では一次構造の相同性に基づく系統的命名法から、CaMKP は PPM1F という名称で呼ばれることが多くなった。近年、CaMKP とがん細胞の遊走・浸潤との關連が相次いで報告されるようになったことから、本酵素は新たなドラッグターゲットとして注目されつつあるが、本酵素を含む PPM ファミリーホスファターゼの特異的阻害剤の報告例は少ない。申請者は以前より CaMKP 特異的阻害剤の開発を目指した探索的研究を進めており、CaMKP 阻害剤として、1-amino-8-naphthol-4-sulfonic acid (ANS) 及び 1-amino-8-naphthol-2,4-disulfonic acid (ANDS) を報告しているが、これらの化合物の特異性はまだ十分ではない。そこで、より特異性の高い阻害剤を開発すべく、(1) 新たな構造を持つ CaMKP 特異的阻害剤の探索、(2) 既報の ANS/ANDS を化学修飾することによる特異性の増強、という二つのアプローチを取ることにした。

2. 研究の目的

上記 (1) のアプローチについては、東大創薬機構より提供された化合物ライブラリーの大規模スクリーニングを行い、ANS/ANDS とは全く構造の異なる CaMKP 特異的阻害活性を持つ化合物を見いだした。(2) のアプローチでは、ANS/ANDS の構造を元に、“アフィニティータグ法”を応用し、より高い阻害特異性を持つ CaMKP 阻害剤を開発し、より特異性の高い阻害剤を開発することを目的とした。本報告書では特許申請の關係上、(1) のアプローチに絞って現状を報告する。

3. 研究の方法

東大創薬機構より提供された約 10 万種の大規模ケミカルライブラリーを用い、合成リン酸化ペプチドを基質としたマラカイトグリーンによる高感度リン酸定量法に基づいた CaMKP アッセイ系を用いて、CaMKP 特異的阻害剤の更なるスクリーニングを行った。コントロールとして近縁のホスファターゼである PPM1A 活性も調べ、PPM1A 活性を阻害しないが、CaMKP 活性を顕著に阻害する化合物を CaMKP 特異的阻害剤の候補とした。CaMKP などのタンパク質のカルボニル化はピオチンヒドラジドを用いたウェスタンブロットティングによって検出した。CaMKI のリン酸化は抗リン酸化 CaMKI によるウェスタンブロットティングによって検出した。

4. 研究成果

大規模スクリーニングの結果、ピロガロール骨格を持つ gallic acid やそのアルキルエステルが、

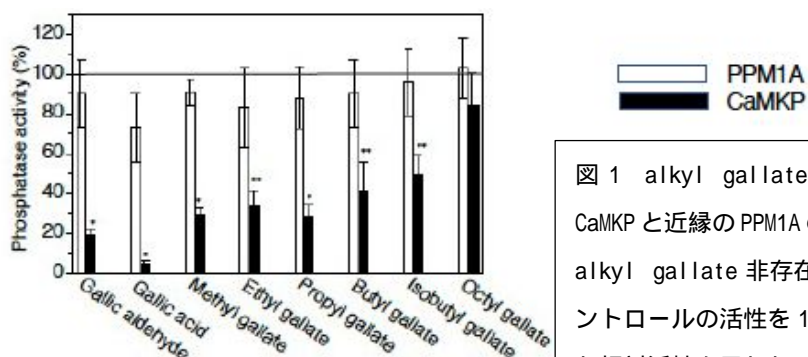


図 1 alkyl gallate による CaMKP と近縁の PPM1A の阻害。alkyl gallate 非存在下のコントロールの活性を 100 とした相対活性を示した。

近縁の PPM1A を殆ど阻害せず、CaMKP を強く阻害することが判明した (図 1)。これらの化合物は阻害に伴って、CaMKP タンパク質を顕著にカルボニル化することが分かった (図 2)。基質リン酸化ペプチド存在下で

はカルボニル化が顕著に亢進すること、このカルボニル化反応には Mn^{2+} や Cu^{2+} 、 Co^{2+} などの 2 価の金属イオンが必須であったこと、ピロガロール骨格の 4 位の水酸基がカルボニル化に必須で

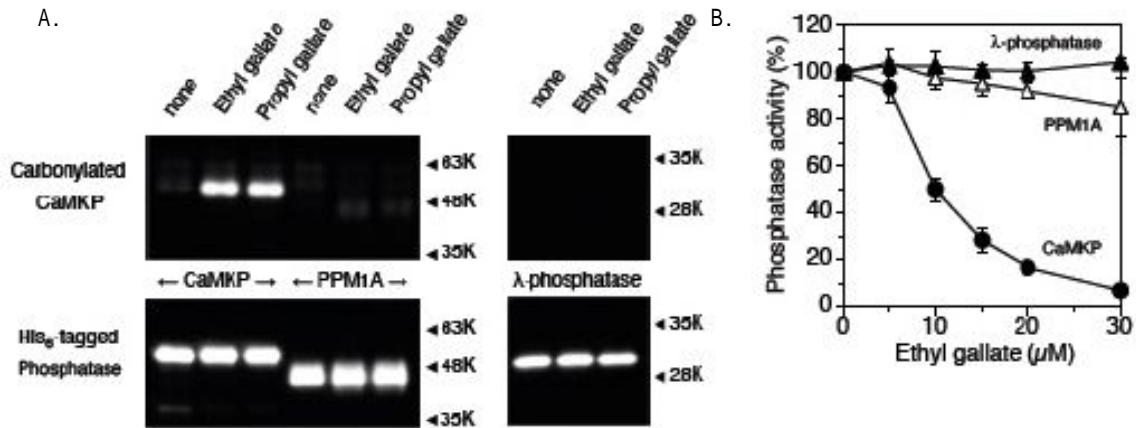


図2 A. alkyl gallate による CaMKP と近縁の PPM1A のカルボニル化。ビオチンヒドライドを用いたウエスタンブロットングにより検出した。B. ethyl gallate による各種ホスファターゼ活性の阻害。alkyl gallate 非存在下のコントロールの活性を 100 とした相対活性を示した。

あることなどから、CaMKP の活性中心の金属結合部位、基質ペプチド結合部位などの活性中心、またはその近傍に gallic acid 及びそのアルキルエステルが結合し、何らかのラジカル反応を介して近傍のアミノ酸側鎖をカルボニル化する結果、CaMKP 活性が不可逆的に阻害される機構が考えられた。gallate ester 以外にも、果物や野菜、漢方薬の成分として知られている gallate 型ポリフェノール類を調べたところ、いくつかの gallate 型ポリフェノールが同様の効果を示すことも見いだしている(未発表データ)。

また興味深いことに、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 を ethyl gallate で処理すると、CaMK キナーゼのリン酸化が顕著に亢進することが判明した(図3)。このデータは、ethyl gallate が細胞内に浸透して CaMKP 活性を抑制し得ることを示唆するとともに、ethyl gallate などポリフェノール類が、CaMKP を介してカルシウムシグナリングに関わるプロテインキナーゼを制御し得ることを示唆しており、ポリフェノール

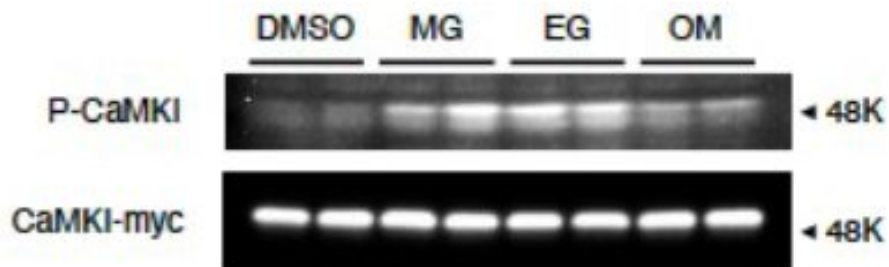


図3 alkyl gallate 添加によるヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 における CaM キナーゼ リン酸化の亢進。MDA-MB-231 に CaM キナーゼ を発現させ、150 μM の各種 gallate を添加し、24 時間培養した後の CaM キナーゼ の活性化に関わる残基のリン酸化をウエスタンブロットングで検出した。

ル類の健康増進作用の分子機構を考える上でも大変興味深い。

阻害剤が酵素をカルボニル化する結果として特異的な阻害をもたらすという例は、我々の知る限りこれまでに知られていない。今回同定された gallic acid 関連化合物の合成展開をおこない、このような新奇な特異的阻害機構を利用した、より阻害特異性・阻害活性の高い阻害/不活化剤をデザインすることができるかも知れない。ethyl gallate, propyl gallate は既に酸化防止剤として広く食品添加物に利用されており、その細胞毒性が極めて低いことが確立されている点は興味深い。より毒性が低く、且つ効果的にがんの転移・浸潤を抑制する薬剤をデザインすることが出来れば、がん細胞の完全撲滅ではなく、がんの転移・浸潤を効果的に抑制して、がんと共存するという新しいコンセプトに基づくがん治

療が可能となる。今後、これらの化合物の構造を元に、様々な化合物をデザインすることで改良を加え、より効果的な“低毒性がん転移抑制剤”の創製を目指していきたい。

この他、これらの研究で得られた化合物の作用の CaMKP への特異性を検証するため、CaMKP 以外の PPM ファミリーホスファターゼの研究にも参画し、酵素学的性質が未解明であった PPM1M のリン酸化による活性制御機構の一端を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osawa J, Karakawa M, Taniguchi A, Inui Y, Usuki C, Ishida A, Kameshita I, Sueyoshi N.	4. 巻 753
2. 論文標題 Functional regulation of the protein phosphatase PPM1M by phosphorylation at multiple sites with Ser/Thr-Pro motifs.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109887
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2018.01.001.	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 秋月 一駿, 末吉 紀行, 亀下 勇, 石田 敦彦	4. 巻 95
2. 論文標題 CaMKホスファターゼの多様な生理機能とその阻害剤研究	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 676-681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950676	査読の有無 無
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 Akizuki K, Shimoda N, Ozaki H, Yamazaki T, Hirano T, Ishihara Y, Sueyoshi N, Kameshita I, Murai T, Ishida A.	4. 巻 639
2. 論文標題 CaMK phosphatase (CaMKP/POPX2/PPM1F) inhibitors suppress the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells with loss of polarized morphology.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2022.109170	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 Shiho Hisaoka, Jin Osawa, Riku Kobashi, Atsuhiko Ishida, Isamu Kameshita, Noriyuki Sueyoshi	4. 巻 649
2. 論文標題 Subcellular distribution of bone morphogenetic protein 2-inducible kinase (BMP2K): Regulation by liquid-liquid phase separation and nucleocytoplasmic shuttling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 16-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.01.076	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 Kazutoshi Akizuki, Shun Ishikawa, Rika Obatake, Hana Ozaki, Nao Shimoda, Tatsuo Nehira, Takeshi Yamazaki, Tomoya Kinumi, Jin Osawa, Noriyuki Sueyoshi, Isamu Kameshita, Yasushi Shigeri, Atsuhiko Ishida	4. 巻 720
2. 論文標題 CaM kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F/POPX2) is specifically inactivated through gallate-mediated protein carbonylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2022.109170	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中根 達人, 王 幸慈, 飯塚 康介, 浅野 吉政, 乙部 優太, 吉種 光, 山肩 葉子, 阿部 学, 崎村 建司, 尾藤 晴彦, 石田 敦彦, 吉村 崇, 杉山 康憲, 深田 吉孝, 金 尚宏
2. 発表標題 低温下での概日リズム生成におけるCaMKIIの役割とその酵素学的な温度特性
3. 学会等名 冬眠休眠研究会 2023 (第5回冬眠休眠研究会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中根 達人, 王 幸慈, 飯塚 康介, 浅野 吉政, 乙部 優太, 吉種 光, 山肩 葉子, 阿部 学, 崎村 建司, 尾藤 晴彦, 石田 敦彦, 吉村 崇, 杉山 康憲, 深田 吉孝, 金 尚宏
2. 発表標題 CaMKIIによるCLOCKのリン酸化における至適温度の低温シフト
3. 学会等名 日本睡眠学会第45回定期学術集会・第30回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石田 敦彦, 秋月一駿, 石川 峻, 大畠 理加, 尾崎 華, 下田 夏緒, 根平 達夫, 山崎 岳, 絹見 朋也, 亀下 勇, 大澤 仁, 末吉 紀行, 茂里 康
2. 発表標題 CaMキナーゼホスファターゼ(CaMKP/PPM1F/POPX2) はガレート依存的なタンパク質カルボニル化反応によって特異的に不活性化される
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中根達人、金尚宏、石田敦彦、杉山康憲
2. 発表標題 CaMKIIの温度依存的な基質特異性の变化
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsuhiko Ishida
2. 発表標題 Specific inactivation of CaM kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F/POPX2) through carbonylation mediated by gallate derivatives
3. 学会等名 Japan-Singapore Advanced Cancer Research Online International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋月 一駿, 下田 夏緒, 平野 哲男, 山崎 岳, 石原 康宏, 谷口 隆信, 末吉 紀行, 亀下 勇, 村井 捻幸, 石田 敦彦
2. 発表標題 ヒト乳がん細胞におけるCaMKP/PPM1F 阻害剤の遊走阻害効果
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (オンライン)
4. 発表年 2021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
研究分担者	根平 達夫 (Nehira Tatsuo) (60321692)	広島大学・統合生命科学研究科(総)・准教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	平野 哲男 (Hirano Tetsuo) (50228805)	広島大学・統合生命科学研究科（総）・助教 (15401)	
研究分担者	秋月 一駿 (Akizuki Kazutoshi) (50881299)	広島大学・統合生命科学研究科（総）・助教 (15401)	

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