

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570146

研究課題名(和文) PPM1Dホスファターゼ過剰発現癌細胞における染色体分配制御の破綻と分子基盤解明

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanism of genome instability in the cells with overexpression of PPM1D

研究代表者

中馬 吉郎 (Chuman, Yoshiro)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：40372263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)： PPM1Dホスファターゼ過剰発現細胞では染色体不安定化が見られるが、その分子機構は不明である。本研究では、PPM1D過剰発現によりp53非依存的に染色体不安定化が引き起こされることが示された。また、PPM1Dの過剰発現により核内タンパク質であるTOP2Aの低リン酸化・活性低下が引き起こされることが明らかとなった。これらの結果から、PPM1D過剰発現により低リン酸化TOP2A増加に伴うTOP2A不活性化が生じ、最終的に染色体分離異常を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： PPM1D was originally identified as a p53-inducible Ser/Thr phosphatase. We have found that PPM1D-overexpressed cells often show "DNA bridge" which is one of chromosome segregation errors, however the mechanism remains obscure.

In this study, we showed that PPM1D overexpression induced DNA bridge in p53-independent manner. Co-immunoprecipitation analysis showed that PPM1D interacts with nuclear phosphorylated protein, TOP2A. Overexpressed PPM1D co-localized with endogenous TOP2A not only in the nucleus but also on the DNA bridge during anaphase in mitosis. Decatenation assay exhibited that overexpressed PPM1D suppresses the TOP2A activity. The phosphorylation analysis of TOP2A exhibited that overexpressed PPM1D induced the elevation of low level of phosphorylated-TOP2A. These data suggested that overexpression of PPM1D induces genome instability through the inhibition of TOP2A activity by the regulation of TOP2A phosphorylation level.

研究分野：生物学

キーワード：ホスファターゼ 酵素 染色体不安定性 がん

1. 研究開始当初の背景

様々な遺伝毒性ストレスにより p53 依存的に誘導される脱リン酸化酵素 PPM1D (Protein Phosphatase Magnesium-dependent 1, Delta) は、正常細胞においては p53 シグナル伝達系を抑制することにより細胞周期制御を行っている。一方、乳癌を含む多くの癌において遺伝子増幅および過剰発現がみられ、PPM1D 過剰発現が細胞癌化に深く関与することが知られている(表 1)。そのため、PPM1D 阻害剤は有望な抗癌剤のターゲットとして期待されており、我々はこれまでペプチド性 PPM1D 阻害剤の開発、ならびに高い親和性・選択性を有する低分子阻害剤の開発に成功してきた。しかしながら、PPM1D 過剰発現による癌化メカニズムについては未知の部分が多く、PPM1D 阻害剤を抗癌剤として実用化するため、そのメカニズム解明が強く望まれている。

表 1. 多様な腫瘍にみられる PPM1D 遺伝子増幅

症例	PPM1D 遺伝子増幅
乳腺癌	11 %
	16 %
	11 %
	35 %
卵巣明細胞腺癌	40 %
神経芽細胞腫	92 %
骨髄芽細胞腫	51 %
	37 %
胃腺癌	74 %
膵臓腺癌	36 %

2. 研究の目的

染色体不安定性は、染色体数の異常、欠損、転座などに代表される多くの癌細胞にみられる特徴であり、発癌メカニズムの一因と考えられている。我々は、LC-MS/MS を用いた新規 PPM1D 結合タンパク質の探索を実施し、これまでにクロマチンリモデリングに重要な役割を果たしているトポイソメラーゼ II α (TOP2A) を同定している。PPM1D 過剰発現細胞において、p53 シグナル経路の過剰抑制とは異なる新規発癌メカニズムが存在するのではないかと考え、「PPM1D 過剰発現による細胞癌化には、TOP2A の機能制御破綻を介した染色体不安定性が関与している」という仮説を立案した。

そこで本研究では、抗癌剤の分子標的薬として期待されている PPM1D 阻害剤の臨床応用への展開を目指し、「PPM1D 過剰発現に伴う TOP2A 機能制御、ならびにゲノム安定性への効果を解析することにより、PPM1D 過剰発現による細胞癌化メカニズムを解明すること」を目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) PPM1D 過剰発現細胞における染色体不安定化評価

生細胞の染色体を Hoechst33342 で染色し、M 期細胞分裂時における DNA Bridge の形成を定量化し、染色体不安定化の指標とした。PPM1D の異所発現による過剰発現系、ならびに内在性 PPM1D を過剰発現している乳がん細胞における PPM1D ノックダウン系を用い、PPM1D 過剰発現による染色体不安定化の定量解析を実施した。

(2) PPM1D と TOP2A 相互作用解析

HA タグ標識した PPM1D を肺がん由来 H1299 細胞に発現させた。抗 HA 抗体、または TOP2A 抗体で免疫沈降を実施し、沈降産物を Western blotting による共沈解析することにより PPM1D と TOP2A の細胞内における相互作用を解析した。

(3) PPM1D と TOP2A の細胞内局在解析

EGFP 融合 PPM1D を培養細胞に発現し、ホルマリンにて細胞を固定した。EGFP 蛍光観察、ならびに抗 TOP2A 抗体を用いた免疫蛍光染色を蛍光顕微鏡を用いて観察することにより、PPM1D と TOP2A の細胞内局在を解析した。

(4) PPM1D 過剰発現による TOP2A 活性への影響評価

TOP2A の活性評価には、連環 DNA である kDNA を基質に用いた Decatenation 活性測定を用い、TOP2A 含有各抽出液処理後の nicked DNA および circular DNA の生成量を定量することにより、PPM1D の発現量の差異による TOP2A 活性への影響を解析した。

(5) PPM1D 過剰発現による TOP2A タンパク質安定性解析

PPM1D の過剰発現細胞系、ならびにノックダウン細胞系を用い、内在性 TOP2A の発現量を Western blotting 解析により定量評価した。

(6) PPM1D 過剰発現細胞における TOP2A リン酸化評価

PPM1D の発現量の違いによる TOP2A のリン酸化による影響については、Phos-Tag 含有アクリルアミドゲルを用いたゲルシフトアッセイにより、定量評価した。また、TOP2A の特定部位のリン酸化評価については、リン酸化ペプチドを化学合成した後、ウサギ免疫し、アフィニティカラムを用いて精製した抗リン酸化ペプチド抗体を作製し、Western blotting 法により解析、評価した。

(7) PPM1D 阻害剤と TOP2A 阻害剤併用による癌細胞増殖抑制効果

我々が開発した PPM1D 阻害剤 SPI-001 と、抗癌剤として知られている TOP2A 阻害剤

Etoposide を PPM1D 過剰発現細胞である乳がん由来 MCF-7 細胞に併用後数日培養し、処理後の細胞数をカウントすることにより、PPM1D 阻害剤と TOP2A 阻害剤併用による癌細胞増殖抑制効果を解析した。また、PPM1D 阻害剤と TOP2A 阻害剤の併用投与による細胞周期に及ぼす影響について、フローサイトメトリーを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) PPM1D 過剰発現細胞における染色体不安定化評価

PPM1D 過剰発現による染色体不安定化への影響を解析するため、PPM1D の異所発現による過剰発現系、ならびに内在性 PPM1D を過剰発現している乳がん細胞を用いた PPM1D ノックダウン系を用いて細胞分裂時における DNA bridge 形成細胞の定量評価を実施した。その結果 PPM1D 過剰発現に伴い染色体不安定化が引き起こされることが確認された(図1)。また、この染色体不安定化は p53 欠損細胞である H1299 細胞においても観察されたことから、PPM1D 過剰発現に伴う染色体不安定化は、p53 非依存的であることが示唆された。

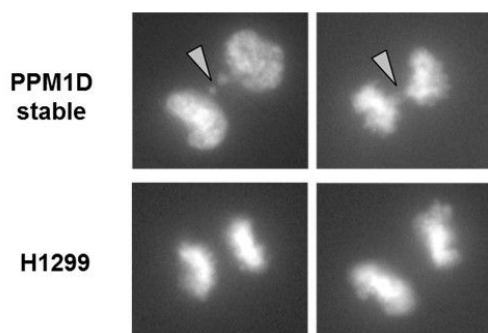


図1 PPM1D による染色体不安定化

(2) PPM1D と TOP2A の相互作用と細胞内局在解析

我々は、PPM1D 新規結合タンパク質として TOP2A を同定している。染色体不安定性を示す細胞において、PPM1D と TOP2A が相互作用することを解析するため、免疫共沈降解析を実施した。その結果、PPM1D の免疫沈降、および TOP2A の免疫沈降に TOP2A と PPM1D がそれぞれ共沈してくることから、PPM1D が細胞内において TOP2A と複合体を形成することが明らかとなった。蛍光顕微鏡を用いた細胞内局在解析より、過剰発現した PPM1D は内在性 TOP2A と核内に共局在することが明らかとなったが、さらに興味深いことに過剰発現した PPM1D は染色体分離異常の際に見られる DNA bridge 上に存在し、TOP2A と共局在することが判明した。このことから、PPM1D の過剰発現により染色体不安定化に重要な役割を果たす TOP2A の活性

が抑制され、染色体不安定化が引き起こされることが示唆された。

(3) PPM1D 過剰発現による TOP2A 活性、安定化への影響

PPM1D 過剰発現に伴う TOP2A 活性への影響を解析するため、PPM1D 過剰発現細胞である乳がん由来 MCF-7 細胞を用いて、Decatenation 活性評価を実施した。PPM1D ノックダウンにより TOP2A 活性の顕著な増加が観察されたことから、PPM1D の過剰発現に伴う TOP2A 活性減少が、染色体不安定化に関係していることが考えられた(図3)。次に、PPM1D 過剰発現に伴う、TOP2A 安定化の評価を実施したところ、予想に反して PPM1D 過剰発現細胞では TOP2A のタンパク質量が増加していることが明らかとなった。PPM1D の酵素活性不活化体では TOP2A タンパク質の増加が見られないことから、PPM1D による TOP2A タンパク質の安定化には PPM1D の酵素活性が必須であることが示された。

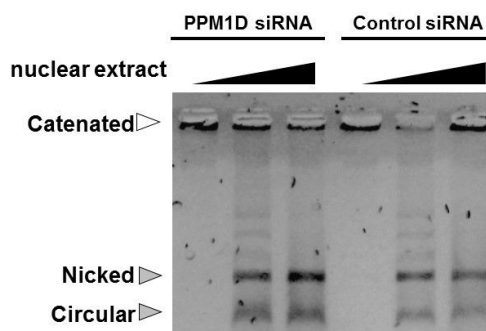


図2 PPM1D 過剰発現による TOP2A 活性阻害

(4) PPM1D 過剰発現細胞における TOP2A リン酸化評価

2量体で機能する TOP2A の酵素活性は、リン酸化により制御されることが知られている。そこで、PPM1D 過剰発現に伴う TOP2A リン酸化レベルへの影響について、Phos-Tag 含有アクリルアミドゲルを用いたゲルシフトアッセイにより解析した。その結果、PPM1D 過剰発現細胞では低リン酸化状態の TOP2A が増大していることが明らかとなった(図3)。そこで、これまで TOP2A の活性に重要な役割を果たしていることが知られている Ser1337 位の高リン酸化ペプチド抗体を作製し、PPM1D 過剰発現に対するリン酸化への影響を解析した。M 期に同調した PPM1D ノックダウン細胞では、コントロールの細胞に比べて、顕著な Ser1337 位のリン酸化レベルが上昇していたことから、PPM1D は TOP2A1337 位のリン酸化レベルを減少させることにより TOP2A 活性を不活性化していることが示された。これらの結果から、PPM1D 過剰発現により低リン酸化

TOP2A 増加に伴う TOP2A 不活性化が生じ、最終的に染色体分離異常を引き起こす可能性が示唆された。

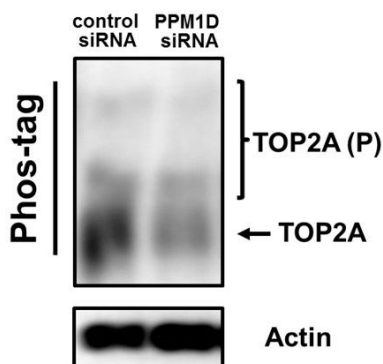


図3 PPM1D による TOP2A リン酸化への影響

(5) PPM1D 阻害剤と TOP2A 阻害剤併用による癌細胞増殖抑制効果

TOP2A 阻害剤は抗がん剤として機能するとともに、その抗癌活性は TOP2A 活性に相関することが知られている。今回の研究により、PPM1D が TOP2A 活性を阻害することが示されたことから、PPM1D 阻害剤と TOP2A 阻害剤を併用することにより、効果的な癌細胞抑制効果が期待される。そこで、我々が開発した PPM1D 阻害剤 SPI-001 と TOP2A 阻害剤である TOP2A の併用投与による癌細胞増殖への効果について解析した。MCF-7 細胞に対して、SPI-001 と TOP2A 阻害剤を併用投与したところ、顕著な細胞増殖抑制効果の増強が見られた。この増強効果は SPI-001 の不活性化体である SL-104 では観察されないことから、PPM1D 阻害と TOP2A 阻害の併用効果に起因することが確認された(図4)。また、フローサイトメトリーを用

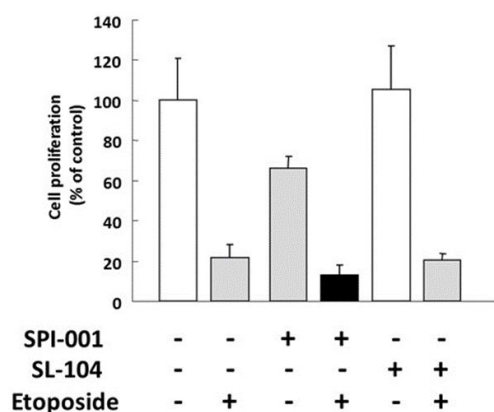


図4 PPM1D 阻害剤と TOP2A 阻害剤併用による細胞増殖抑制効果

いた細胞周期解析から、併用処理した細胞では sub-G1 期の細胞の顕著な増加が見られたことから、アポトーシスにより細胞増殖抑制

効果の増強が引き起こされることが示唆された。これらの結果から、PPM1D 阻害剤と TOP2 阻害剤の併用法は有用な抗癌療法の一つとして展開できることが示唆された。

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 13 件)

1. Namba, K., Osawa, A., Nakayama, A., Mera, A., Tano, F., Chuman, Y., Sakuda, E., Taketsugu, T., Sakaguchi, K., Kitamura, N., and Tanino, K. Synthesis of Yellow and Red Fluorescent 1,3a,6a-Triazapentalene and Theoretical Investigation of Optical Properties. *Chem. Sci.*, 6, 1083-1093, (2015) 査読有
DOI: 10.1039/C4SC02780A
2. Xaviera, C.P., Melikova, M., Chuman, Y., Üren, A., Baljinyam, B., Rubin, J.S. Secreted Frizzled-Related Protein Potentiation versus Inhibition of Wnt3a/ β -catenin Signaling. *Cell. Signal.* 26,94-101, (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.09.016
3. Chuman, Y., Ueyama, M., Sano, S, Wu, F, Kiyota, Y., Higashi, T., Osada, S., and Sakaguchi, K. Effects of *E/Z* Configuration of Fluoroalkene-containing HDAC Inhibitors on Selectivity for HDAC Isoforms. *Chem. Lett.* 42(8), 833-835, (2013) 査読有
DOI: 10.1246/cl.130243
4. Sakaguchi, T., Janairo, J.I., Chuman, Y., Hara, K., Fukuoka, A., and Sakaguchi, K. Silver nanocrystals formed by oligomeric biomineralization peptide via p53 tetramerization domain. *Peptide Sci.* 2012, 57-58, (2013) 査読有
DOI: 10.1002/adfm.201300577
5. Shirahata, Y., Chuman, Y., Iwamuro, R., Janairo, J.I., Kiyota, Y., Yagi, H., Sakaguchi, K. Analysis of substrate preference of human PPM1 type Ser/Thr phosphatases. *Peptide Sci.* 2012, 403-404, (2013) 査読有
6. Wada, J., Kamada, R., Imagawa, T., Chuman, Y., and Sakaguchi, K. Inhibition of tumor suppressor protein p53-dependent transcription by a tetramerization domain peptide via hetero-oligomerization *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22(8), 2780-2783, (2012) 査読有
DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.02.085
7. Yagi, H., Chuman, Y., Kozakai, Y., Imagawa, T., Takahashi, Y., Yoshimura, F.,

- Tanino, K., and Sakaguchi, K. A Small Molecule Inhibitor of p53-inducible Protein Phosphatase PPM1D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22(1), 729-732, (2012) 査読有
DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.10.084
8. Sakai, H., Watanabe, K., Chuman, Y., Uosaki, K., Sakaguchi, K. Formation of functionalized nanowires using structure-controllable amyloid peptides. *Peptide Sci.* 2011, 23-24, (2012) 査読有
 9. Kozakai, Y., Yagi, H., Teduka, Y., Chuman, Y., Sakaguchi, K. Analysis of interaction between p53 inducible protein phosphatase PPM1D and nucleolar protein. *Peptide Sci.* 2011, 43-44, (2012) 査読有
 10. Janairo, J.I., Iwamuro, R., Kaya, S., Yagi, H., Chuman, Y., Imagawa, T., Sakaguchi, K. Probing the differential phosphothreonine and metal selectivity of human PPM1 phosphatase family. *Peptide Sci.* 2011, 245-246, (2012) 査読有
 11. Wada, J., Kamada, R., Chuman, Y., Imagawa, T., Sakaguchi, K. Repression of p53 transcriptional activity by inhibitory peptide via heterotetramerization. *Peptide Sci.* 2011, 301-302, (2012) 査読有
 12. Sakaguchi, T., Kamada, R., Chuman, Y., Sakaguchi, K. Nanostructure formed by biomineralization peptide oligomerized via p53 tetramerization. *Peptide Sci.* 2011, 345-346, (2012) 査読有
 13. Yagi, H., Chuman, Y., Kozakai, Y., Imagawa, T., Sakaguchi, K. Involvement of PPM1D specific Pro-loop in regulatory mechanism of PPM1D phosphatase activity *Peptide Sci.* 2011, 373-374, (2012) 査読有
- [学会発表](計 21 件)
1. 峯健太、坂口達也、佐々木慎一郎、中馬吉郎、鎌田瑠依、坂口和靖、DNA 高次構造体を介した多量体化バイオミネラリゼーションペプチドによる銀ナノ構造体形成、日本化学会北海道支部 2015 年冬季研究発表会、2015/1/27-28、北海道大学(札幌市)
 2. 打野 亮、杉山 伸、中馬吉郎、古川和広、In vivo における lamin ドメイン特異的なクロマチン相互作用および重合形成の解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014/11/25-27、パシフィコ横浜、(横浜市)
 3. 小熊義樹、打野 亮 中馬吉郎、杉山伸、古川和広、Drosophila モデル動物を用いた心臓形成における A-type lamin の機能解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014/11/25-27、パシフィコ横浜(横浜市)
 4. 田英恵、打野亮、中馬吉郎、杉山伸、古川和広、複眼形成における Drosophila A, B-type lamin の機能解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014/11/25-27、パシフィコ横浜(横浜市)
 5. 二木瞭、打野亮、山本洋敬、角山貴昭、中馬吉郎、杉山伸、古川和広、ショウジョウバエを用いたプレニル化による lamin の動態解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014/11/25-27、パシフィコ横浜(横浜市)
 6. Chuman, Y., Ogasawara, S., Fujita, A., Kozakai, Y., and Sakaguchi, K. Induction of genome instability by overexpression of PPM1D phosphatase in cancer cells, 11th International Conference on Protein Phosphatase, 2014/11/12-14, Tohoku University (Sendai)
 7. Kiyota, Y., Ogasawara, S., Shirahata, Y., Matsuyama, Y., Nishimura, Y., Chuman, Y., Shimohigashi, Y., and Sakaguchi, K., Analysis of Active Sites in Human PPM1 Phosphatase Family, 11th International Conference on Protein Phosphatase, 2014/11/12-14, Tohoku University (Sendai)
 8. Ogasawara, S., Kiyota, Y., Chuman, Y., Yoshimura, F., Tanino, K., and Sakaguchi, K., Development of small molecule PPM1D phosphatase inhibitors, 11th International Conference on Protein Phosphatase, 2014/11/12-14, Tohoku University (Sendai)
 9. 中馬吉郎, PPM1D ホスファターゼ過剰発現による新規発癌機、第 46 回若手ペプチド夏の勉強会、2014/8/3-5、京都府立青少年海洋センター(宮津市)
 10. 中馬吉郎・藤田章弘、小笠原紗里、小境夕紀、梨本健紘、水上洋平、今川敏明、坂口和靖、ヒト PPM1D ホスファターゼによる染色体不安定化と新規発がん機構、第 55 回新潟生化学懇話会、2014/6/28、長岡技術科学大学(長岡市)
 11. 中馬吉郎、翻訳後修飾酵素の制御異常による発がん機構と抗がん剤の開発、第 4 回グリーンケミストリー研究シンポジウム、2014/3/18、新潟大学(新潟市)
 12. Chuman, Y., Ogasawara, S., Fujita, A., Kozakai, Y., and Sakaguchi, K., Genome Instability in the Cells Overexpressing

- p53-inducible Protein Phosphatase PPM1D, 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatases, 2013/11/27-12/1, National Health Research Institutes (Taiwan)
13. Shirahata, Y., Kiyota, Y., Iwamuro, R., Chuman, Y., and Sakaguchi, K., Substrate specificity of human PPM1 type Ser/Thr phosphatase, 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatases, 2013/11/27-12/1, National Health Research Institutes (Taiwan)
 14. Kozakai, Y., Chuman, Y., Yagi, H., and Sakaguchi, K., Overexpression of protein phosphatase PPM1D induces an abnormal nucleolar formation by hypersphosphorylation of nucleophosmin through CDD1-PLK1-cascade, 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatases, 2013/11/27-12/1, National Health Research Institutes (Taiwan)
 15. 中馬吉郎, p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D 研究の新展開, 生物化学研究会 2013, 2013/9/21, 北海道大学 (札幌市)
 16. 中馬吉郎・藤田章弘、小笠原紗里、小境夕紀、梨本健紘、水上洋平、今川敏明、坂口和靖, p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D 過剰発現による染色体不安定性機構, 第 86 回日本生化学会, 2013/9/11-13, パシフィコ横浜 (横浜市)
 17. 中馬吉郎・藤田章弘、小笠原紗里、小境夕紀、梨本健紘、水上洋平、今川敏明、坂口和靖, 17q23 にコードされた PPM1D ホスファターゼ過剰発現による染色体不安定化, 第 50 回 日本生化学会北海道支部会, 2013/7/26, 北海道大学 (札幌市)
 18. Chuman, Y., Shirahata, Y., Kiyota, Y., Iwamuro, R., Janairo, J.I., Yagi, H., and Sakaguchi, K., Recognition of Phosphorylated Ser/Thr residues by Human PPM1 Family Phosphatases, 10th International Conference on Protein Phosphatase, 2013/2/7-9, Foundation for Promotion of Cancer Research (Tokyo)
 19. 中馬吉郎・岩室良・白幡祐貴子・Jose Isagani B. Janairo・清田雄平・八木寛陽・坂口和靖, ヒト PPM1 ホスファターゼにおけるリン酸化アミノ酸選択性, 第 85 回日本生化学会, 2012/12/14-16, 福岡国際会議場 (福岡市)
 20. Chuman, Y. Iwamuro, R., Shirahata, Y., Janairo, J.I., Kiyota, Y., Yagi, H., and Sakaguchi, K., Ser/Thr specificity and metal preference in human PPM1 family phosphatases, 第 49 回ペプチド討論会, 2012/11/7-9, かごしま県民交流センター (鹿児島市)
 21. Chuman, Y., Michiba, T., Sakaguchi, K., Expression of p53-inducible Protein phosphatase PPM1D in Pluripotent Human Germ Cell Tumor-derived Cell Line, NCCIT, The 58th/60th NIBB Conference "Germline -Specification, Sex, and Stem Cells-", 2012/7/17-21, Okazaki Conference Center (Okazaki)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
 中馬 吉郎 (CHUMAN YOSHIRO)
 新潟大学・自然科学系・准教授
 研究者番号: 40372263
- (2) 研究分担者
 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