

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

鎌田 瑠泉¹，中馬 吉郎²，小境 夕紀¹，坂口 和靖¹

DNA損傷に応答し、p53依存的に誘導されるMg²⁺- or Mn²⁺-dependent protein phosphatase (PPM) ファミリーホスファターゼとして同定されたPPM1D (Wip1) は、乳がんや卵巣がんなどのさまざまながん細胞においてその遺伝子増幅や過剰発現が報告されており、抗がん剤の標的として大きく注目されている。PPM1Dはがん抑制タンパク質p53や、細胞周期制御に関わる多くのタンパク質を脱リン酸化・不活性化し、p53経路を含むさまざまな経路を負に制御している。PPM1Dを標的とした抗がん剤を開発するためには、PPM1Dの機能制御機構およびその発がん機構を詳細に解析していくことが必要である。本稿では、PPM1Dの構造や基質認識機構、PPM1D過剰発現による細胞がん化機構について概説するとともに、近年報告されているPPM1D特異的阻害剤について紹介する。

1. はじめに

PPM1Dは別名Wip1 (wild-type p53 induced phosphatase 1) と呼ばれ、赤外線照射後にがん抑制タンパク質p53依存的に誘導されるSer/Thrホスファターゼとして1997年著者を含むグループにより同定された¹⁾。PPM1D遺伝子はヒト染色体17q23に位置し、605アミノ酸残基からなるPPM1Dをコードしている。PPM1DはN末端に触媒ドメイン、C末端に核内移行シグナルを含む調節ドメインから形成される。近年PPM1Dの遺伝子増幅と過剰発現が乳がんを含むさまざまながん細胞において報告されており、PPM1Dは抗がん剤の標的として注目されている。本稿で

は、PPM1Dの構造や機能について述べるとともに、がんの原因タンパク質としてのPPM1Dの機能およびPPM1Dを標的とした抗がん剤開発の現状と今後の展望について述べる。

2. がん原遺伝子産物PPM1D

1) PPMタイプSer/ThrホスファターゼPPM1D

PPM1D遺伝子のプロモーター領域には、p53、サイクリックAMP、NF- κ B、ER α 、E2F1などの転写結合部位が存在し、これらの転写因子がさまざまなストレスに対し、発生過程や組織特異的に、PPM1D発現を精密に制御されていると考えられる。著者らは、複数のヒト由来がん細胞の解析から、ヒトPPM1Dには605残基からなる従来型のPPM1Dに加え、共通の触媒ドメインを有するもののC末端が特徴的な10残基に置換されたPPM1D430が存在することをmRNAおよびタンパク質レベルで同定している(図1A)²⁾。PPM1Dの遺伝子解析により、PPM1D430はPPM1D遺伝子のエキソン5とエキソン6の間のイントロンにストップコドンを含む新たなエキソンが転写されることによるスプライスバリエーション体であることが明らかとなった(図1B)。PPM1Dが広範な発現パターンを示す一方、PPM1D430は精巣と白血球に特徴的な発現パターンを示す。

¹北海道大学大学院理学研究院化学部門生物化学研究室 (〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目)

²新潟大学理学部化学科生物化学研究室 (〒950-2181 新潟市西区五十嵐2の町8050)

Function of Proto-oncogene Product PPM1D and Development of PPM1D Inhibitors for Cancer Chemotherapy

Rui Kamada¹, Yoshiro Chuman², Yuuki Kozakai¹ and Kazuyasu Sakaguchi¹ (¹Laboratory of Biological Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, North 10, West 8, Kita-ku, Sapporo 060-0810, JAPAN, ²Laboratory of Biological Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Niigata University, 8050, Igarashi 2, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870531

© 2015 公益社団法人日本生化学会

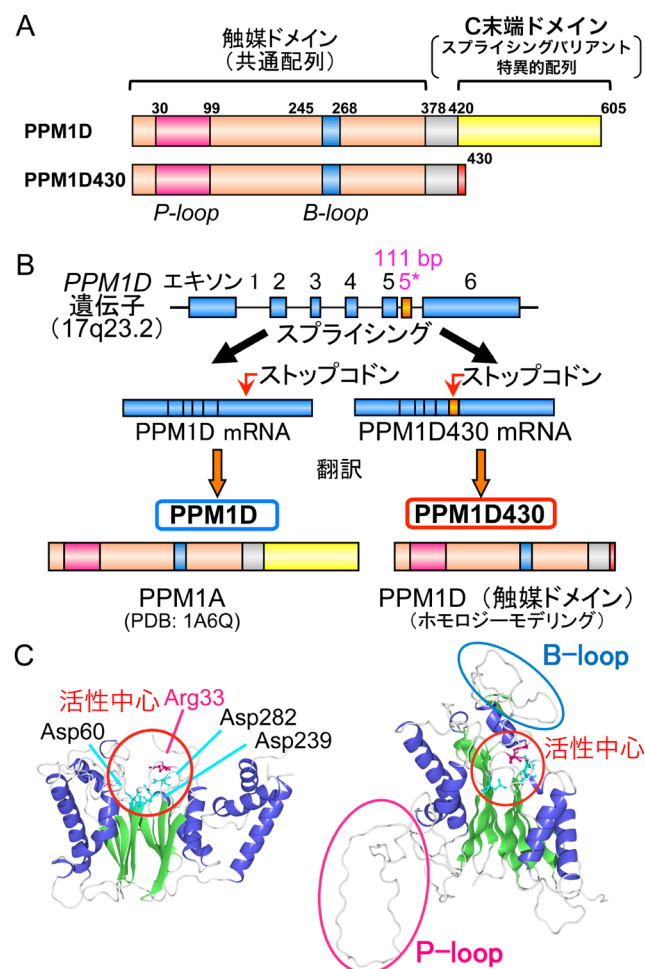


図1 PPM1Dの構造

(A) PPM1DにはProに富むP-loopと、塩基性残基に富むB-loopが存在する。N末端領域には触媒ドメインを含む1~420残基の共通する配列を持ち、C末端領域にはスプライスバリエント特異的な配列を有している。(B) PPM1Dには605残基からなる従来型のPPM1Dと、共通の触媒ドメインを有するPPM1D430が存在する。(C) PPM1D触媒ドメインの構造(ホモロジーモデリング)

2) PPM1Dの構造

PPM1Dを含むPPMホスファターゼは、その酵素活性発現に Mg^{2+} や Mn^{2+} の金属イオンを必要とし、金属イオンに配位した水分子が求核分子として作用することにより基質タンパク質からの脱リン酸化を触媒する³⁾。活性中心を形成する金属配位残基、ならびにリン酸結合残基アミノ酸はPPMファミリーに高度に保存されている一方、PPM1Dは他のPPMファミリーには存在しない塩基性に富んだB-loopならびにProに富んだP-loopが存在している⁴⁾。PPM1Dの結晶構造はいまだに明らかにされていないが、PPMファミリーであるPPM1A, PPM1B, PPM1Kの結晶構造を基にしたホモロジーモデリングの結果から、B-loopは活性中心近傍に存在し、P-loopは活性中心と反対の面に露出することが示されている(図1C)^{4,5)}。合成リン酸化ペプチドや組換えタンパク質を用いた解析により、B-loopは基質認識や細胞内局在に重要な役割を果たすこと、また、P-

表1 がん細胞におけるPPM1D遺伝子増幅

腫瘍	遺伝子増幅	mRNA過剰発現	免疫組織化学法過剰発現
乳がん	37/326 (11%)		
	26/164 (16%)		
	13/117 (11%)		
		7/20 (35%)	
卵巣がん	8/95 (8%)		
	10/181 (6%)		
神経芽腫	8/20 (40%)		
	9/89 (10%)		
神経芽腫	23/25 (92%)	9/32 (28%)	
	24/47 (51%)	148/168 (88%)	
髄芽腫	6/16 (37%)	3/11 (27%)	
	7/11 (64%)	16/33 (48%)	
鼻咽頭がん		59/85 (69%)	
大腸がん		252/368 (68%)	
結腸直腸がん			102/120 (85%)
腎臓がん			53/78 (68%)
肺がん		52/75 (69%)	
肝臓がん		56/86 (65%)	
胃がん		35/53 (74%)	
前立腺がん	0/3 (0%)	3/3 (100%)	
膵臓がん	8/13 (62%)		

loopはタンパク質の分子認識やタンパク質の安定性に寄与すると考えられる⁴⁾。これらPPM1D特異的なループを標的とした阻害剤はPPM1Dをターゲットとした抗がん剤の開発において非常に注目されている。

3) がん細胞にみられるPPM1Dの遺伝子増幅、過剰発現、C末端欠損変異

PPM1Dの遺伝子増幅ならびに過剰発現が、乳がん、卵巣明細胞がん、神経芽腫を含む多くのがん細胞において検出されることから、当初よりPPM1Dは細胞がん化と強い相関があると考えられてきた(表1)^{6,7)}。実際に、PPM1Dノックアウトマウスの解析では、細胞がん化に対して抵抗性を持つとともに、ErbB2とHras1による腫瘍形成を抑制すること、また、PPM1D過剰発現細胞では、アポトーシスや細胞周期停止刺激に対して耐性を持つこと、さらには、いくつかの発がんタンパク質と共発現することにより、細胞がん化を引き起こすことが報告されている⁸⁻¹⁰⁾。これらの事実から、PPM1D遺伝子は現在がん原遺伝子として考えられている。この作用にはPPM1Dのホスファターゼ活性が必要であることが知られており、抗がん剤として展開が期待されるPPM1D阻害剤の開発が積極的に実施されている。さらに、PPM1D阻害による細胞増殖抑制効果がPPM1D過剰発現細胞にみられる一方、正常細胞には影響を与えないことが報告されており、PPM1D阻害剤

は副作用の少ない抗がん剤として期待されている¹¹⁾。

近年、乳がんや卵巣がん患者からPPM1DのC末端欠損変異が相次いで報告され、これらPPM1DのC末端欠損体が機能を獲得 (gain of function) して高活性化することにより細胞がん化を引き起こすことが報告されている¹²⁻¹⁴⁾。これらC末端欠損体はエキソン6における点変異やフレームシフトに起因するが、その gain of function のメカニズムは明らかにされていない。

3. PPM1D異常による細胞がん化メカニズム

1) PPM1Dによるp53ネガティブフィードバック機構とシグナル伝達制御

PPM1Dの細胞がん化メカニズムの中心の一つにp38-p53シグナルのネガティブフィードバック機構がある (図2)。興味深いことに、がん抑制タンパク質p53の変異はがん細胞の半数以上という最も高頻度にみられる遺伝子変異であるが、多くのPPM1D過剰発現がん細胞においてp53の変異はみられず正常型p53が発現している^{13, 15-17)}。この理由として、PPM1Dの過剰発現がp53のがん抑制機能を減衰させることにより腫瘍形成に関与していることが考えられる。実際にこれまでPPM1Dはがん抑制タンパク質p53経

路に関連するp38, ATM, Chk1, Chk2, γ -H2AXなど多くのタンパク質を脱リン酸化・不活性化することによりp53経路を負に制御することが*in vitro*と*in vivo*で示されており (図2, 表2)^{18, 19)}、p53経路の抑制がPPM1Dによる発がん機構

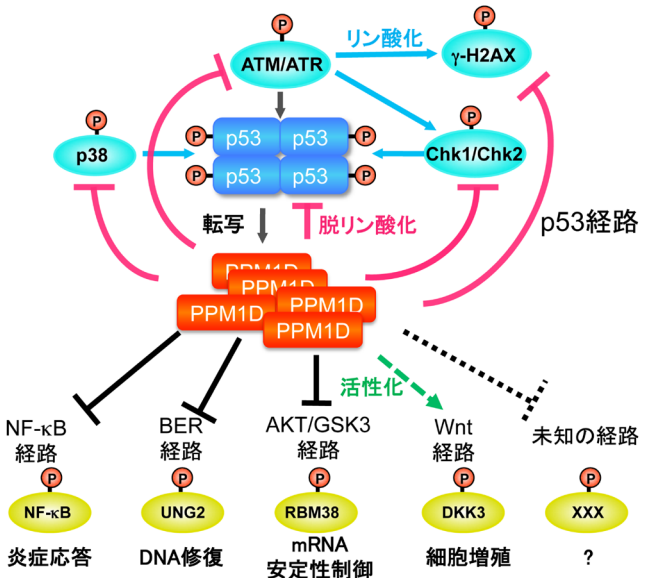


図2 PPM1D過剰発現による細胞がん化メカニズム

表2 PPM1Dの基質

標的タンパク質	配列	機能
pS/pTQモチーフ		
p53 (15pS)	VEPPLpSQETFS <u>D</u>	p53 活性阻害
Chk1 (345pS)	QGISFpSQPTCP <u>D</u>	Chk1 活性阻害
ATM (1981pS)	AFE <u>E</u> GpSQSTTIS	ATM 活性阻害
γ -H2AX (139pS)	KKATQpSQE <u>Y</u>	DNA 修復阻害
XPA (196pS)	LEVWGpSQE <u>A</u> LE	NER 阻害
XPC (892pS)	EEGTSpSQAE <u>A</u> AA	NER 阻害
HDM2 (395pS)	ES <u>E</u> DYpSQPSTS	MDM2 安定化による p53 不安定化
MDMX (403pS)	HS <u>S</u> ESpSQETISS	MDMX 安定化による p53 不安定化
Chk2 (68pT)	LETVSpTQEL <u>Y</u> S	Chk2 活性阻害
DAXX (564pS)	EE <u>S</u> PVpSQLFE <u>L</u> E	ARF を介した抗がん活性の低下
pTXpYモチーフ		
p38 (180pTGpY)	TDDEMpTGpYVAT <u>R</u>	p38 活性阻害
UNG2 (126pTVpY)	ERKHYPpTVpYPP <u>H</u>	BER 阻害
その他		
NF- κ B (536pS)	DEDFSpSIAD <u>M</u> D	NF- κ B 活性阻害
MKK4 (261pT)	DSIAKpTRAD <u>G</u>	MKK4 活性阻害
RBM3 (195pS)	YPYAApSPATA <u>A</u>	p53 mRNA の不安定化
dp21 (121pS)	TD <u>F</u> YHpSKRR <u>L</u> IF	p21 の減少
BAX (172pT)	pTPTWQpTVpTIF <u>V</u>	アポトーシス阻害
BAX (174pT)	WQpTVpTIFVAG <u>V</u>	
BAX (184pS)	GVLTApSLpTIW <u>K</u>	
H4 (47pS)	GVKRIpSGLIpTE <u>E</u> T	H3.3 ダイナミクス制御

*下線は酸性残基を示している。カッコ内の残基はPPM1Dの脱リン酸化部位を示している。

の主要因の一つであると考えられる。

一方、近年 PPM1D の過剰発現が正常型 p53 の細胞のみならず p53 変異型の細胞にも効果的に細胞増殖抑制を示すことが報告されている²⁰⁾。Demidov らは、PPM1D 過剰発現の抑制により Bax/Bcl-X1 の比が変化し、アポトーシス感受性が高くなることを示しており²¹⁾、PPM1D 阻害剤が p53 遺伝子の状態に関係なく、抗がん剤として有効に機能することを示唆するものである。また、PPM1D の p53 経路以外に対する制御機構もいくつか報告されてきている。PPM1D は UNG2 の脱リン酸化を介して塩基除去修復 (BER) を抑制するとともに、XPA/XPC の脱リン酸化を介してヌクレオチド除去修復 (NER) を抑制することで DNA 修復機構を抑制している²²⁾。また、NF- κ B を脱リン酸化・不活性化することにより、炎症反応の抑制にも機能している²³⁾。このように現在では、PPM1D の過剰発現に伴う細胞がん化のメカニズムが多様なシグナル伝達制御の破綻に起因することが明らかになりつつある (図2)。

2) PPM1D の基質認識機構

in vitro ならびに *in vivo* における PPM1D 標的タンパク質の解析より、これまで2種類の基質モチーフ、すなわち pS/pTQ モチーフならびに pTXpY モチーフが知られている (表2)。pS/pTQ モチーフは、ATM/ATR に代表されるホスファチジルイノシトール3-キナーゼが S/TQ 含有基質をリン酸化することにより生じるモチーフである。ATM/ATR は、さまざまな遺伝毒性ストレスにより活性化されることが知られているが、PPM1D は p53, ATM, Chk1, Chk2, γ -H2AX といった ATM/ATR によりリン酸化された pS/pTQ モチーフを脱リン酸化することにより、生体内のストレス応答反応を負に制御する。pS/pTQ モチーフについては、脱リン酸化部位の N 末端側-2 および-3 に位置する酸性残基が PPM1D の基質指向性を上昇させることが報告されている²⁴⁾。また、もう一つの PPM1D 基質モチーフである pTXpY モチーフは、遺伝毒性ストレスに応答して細胞増殖抑制に関与する p38 MAP キナーゼや、遺伝子修復に機能する UNG2 にみられ、PPM1D はこれらの部位を脱リン酸化することにより不活性化する^{25, 26)}。このように PPM1D の基質特異性からも PPM1D はストレス応答のシグナル伝達の抑制因子として機能することが示されている。

一方、これらのモチーフを含まない基質も最近報告されてきている。これらは上述した PPM1D の基質モチーフは含まないが、脱リン酸化近傍に Glu や Asp 残基ならびにリン酸化アミノ酸を含む酸性残基に富んだ配列を有しており、PPM1D は酸性残基に富んだ基質に対する指向性が認められる²⁷⁾。PPM ファミリーの一つである PPM1A は、塩基性残基に富んだ基質を好むことが知られており、PPM1D 特異的な B-loop が PPM1D の基質特異性に重要な役割を果たしていると考えられる^{4, 28)}。このような PPM1D 基質モチーフや酸性残基に富む基質に対する指向性の解析は、PPM1D 特異的な阻害剤の開発や PPM1D の新規標的の

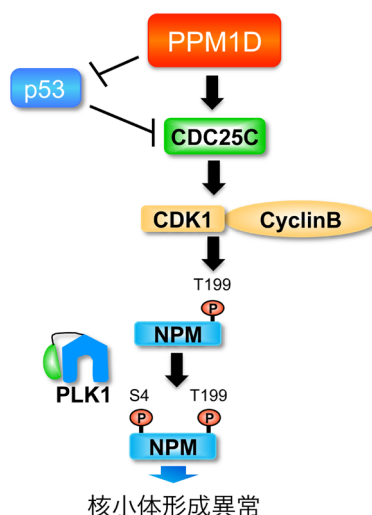


図3 PPM1D 過剰発現による NPM のリン酸化機構と核小体形成異常

子の探索において重要な知見を与えることが期待される。

3) PPM1D 過剰発現による核小体形成異常

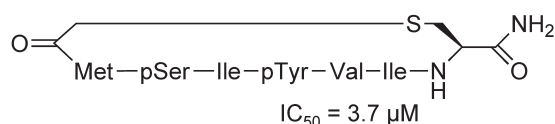
著者らは、PPM1D 過剰発現による新規細胞がん化分子メカニズムとして、核小体形成異常に関与する機構を同定している (未発表)。がん細胞では、リボソーム合成の中心的な器官である核小体の形成に異常がみられることが知られている²⁹⁾。核小体タンパク質である Nucleophosmin (NPM) は核小体形成やリボソーム合成に関与する多機能タンパク質である。著者らは PPM1D が過剰発現している p53 野生型乳がん由来 MCF-7 細胞において、PPM1D 発現量の抑制および PPM1D 特異的な阻害剤が核小体数を減少させることを示した。さらに、p53 欠損型肺がん由来 H1299 細胞においても、PPM1D の発現量に依存した核小体数の変化を観察した。また、MCF-7 における PPM1D ノックダウンが、NPM において CDK1 標的部位である Thr199 および PLK1 標的部位である Ser4 のリン酸化を減少させること、さらに、これらのリン酸化部位が核小体数の増加を誘導することを明らかとした。また、CDK1 による NPM の Thr199 のリン酸化が、PLK1 による NPM の Ser4 のリン酸化を著しく向上させることを示した。さらに、CDK1 の活性化ホスファターゼである CDC25C は、p53 非依存的・依存的な両方の経路で PPM1D の過剰発現により活性化される可能性が示唆された。以上の結果より、PPM1D 過剰発現による CDC25C-CDK1-PLK1 経路の活性化が引き起こす NPM のリン酸化機構および核小体数増加という新規細胞がん化モデルを提案した (図3)。

4. PPM1D 阻害剤

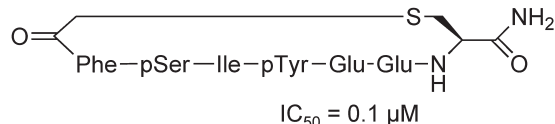
1) 副作用の少ない抗がん剤としての PPM1D 阻害剤

PPM1D の過剰発現や C 末端欠損変異が悪性腫瘍の原因となっていることはこれまで述べてきたとおりである。

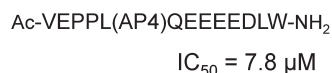
環状ペプチド



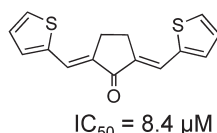
環状ペプチド



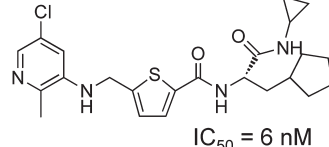
AP4-3E-A



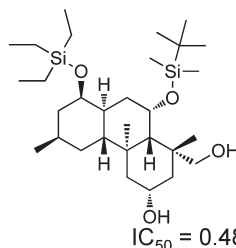
CCT007093



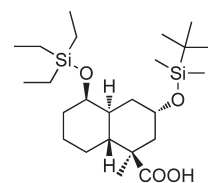
GSK2830371



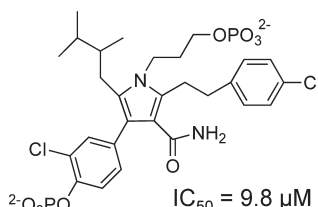
SPI-001



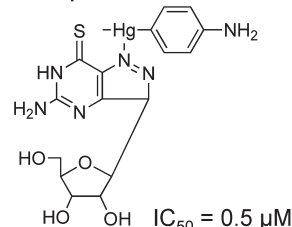
SL-176



ピロール骨格



Compound M



Compound 26

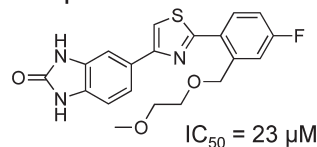


図4 PPM1D特異的阻害剤

Ppm1d ノックアウトマウスが悪性腫瘍に対して抵抗性を示すこと、さらには *Ppm1d* のノックダウンによりがん細胞の増殖が抑制されることから、PPM1Dは抗がん剤のターゲットとして注目を集めている³⁰⁾。現在までに、複数のアプローチ法により PPM1D 特異的阻害剤の開発が進められている。本節では、現在までに報告されている PPM1D 阻害剤について紹介する (図4)。

i) ペプチド性 PPM1D 阻害剤

Appellaらは、PPM1Dの基質配列を基にして、pSXpYモチーフを持つペプチドが PPM1D 阻害活性を示すことを見だし、環状ペプチド阻害剤 c(MpSIpYVA)、 $K_i < 1.0 \mu\text{M}$ ³¹⁾ および環状チオエステルペプチド阻害剤 c(FpSIpYEEC)、 $K_i = 110 \text{ nM}$ ²⁸⁾ を開発している。これらは競合阻害剤であり、他のファミリーに属するホスファターゼ PP2Cα および PP2A には阻害効果を示さず、非常に高い選択性を有していることが示されている。さらには、環状ペプチド阻害剤 c(MpSIpYVA) の構造をミミックした有機化合物アナログであるピロール骨格阻害剤も PPM1D に対する高い選択性を保持していることが報告されている³²⁾。

著者らもペプチド性阻害剤の開発を実施し、基質のリン酸化セリンを非加水分解性リン酸化セリンミミック体 2-amino-4-phosphonobutyric acid (AP4) に置換した各種ペプチドを合成した。著者らは、PPM1Dが酸性アミノ酸に富んだ配列を基質として好むことから、p53(10-35)由来の AP4 含有阻害剤ペプチドに酸性残基である Glu 残基を導入することで、阻害活性を上昇させた PPM1D 阻害剤 AP4-3E-A を報告している (図4)⁴⁾。興味深いことに、AP4-3E-A は不拮抗阻害剤として作用する、これまでに報

告されていない新規な PPM1D 阻害剤である。

ii) 小分子 PPM1D 阻害剤

小分子阻害剤は、細胞内への取り込みや体内における安定性の観点から、抗がん剤として有用であるとされている。このため、これまでに多くの研究者が、さまざまな化合物ライブラリーから PPM1D 阻害剤を同定し、その効果を解析している。2005年には、Developmental Therapeutics Program NCI/NIHの化合物ライブラリーから PPM1D 阻害剤 Compound M (M321237) が同定され、この阻害剤が担がんマウスにおいて腫瘍サイズを抑制することが報告されている (図4)³³⁾。

さらに、別の化合物ライブラリーからも PPM1D に対して阻害効果を持つ数種の化合物が同定され、マイケル反応のアクセプターであるチオールを有する CCT007093 が報告されている (図4)¹¹⁾。CCT007093 は、PPM1D の RNAi によるノックダウンと同様の効果を示し、PPM1D 過剰発現がみられる細胞内においてリン酸化 p38 の上昇と細胞増殖抑制を示すことが示されている。GSK2830371 は、コア領域にアミノ酸様の構造を持つ capped amino acids (CAA) としてデザインされた化合物ライブラリーから同定された阻害剤である (図4)³⁴⁾。この阻害剤は *in vitro* において強い PPM1D 阻害活性を持ち、*in vivo* においても p53 依存的に細胞増殖抑制を示す。また、担がんマウスへの投与によるリン酸化 p53 の上昇および腫瘍サイズの抑制を誘導することが報告されている。ところで、GSK2830371 は細胞内において PPM1D のタンパク質量も減少させることが示されている。同様に細胞内の PPM1D レベルを減少させる化合物として、2,4-bisarylthiazoles (Compound 26) が報告されて

おり (図4), この化合物は*in vitro*におけるホスファターゼ活性阻害能は示さないが ($IC_{50}=23\mu M$), 細胞増殖阻害効果が高いことが示されている³⁵⁾. これらの阻害剤は, 細胞内においてPPM1D以外の標的へも作用する可能性が示唆される.

PPM1D特異的阻害剤SPI-001は, 著者らによって天然合成過程の保護基を含んだ中間体からなる独自の化合物ライブラリーからのスクリーニングによって見いだされた (図4)³⁶⁾. このSPI-001は, 今まで報告されている阻害剤とは異なるタイプの新規骨格を有しており, PPM1Dに対して高い選択性と阻害能を有している. 著者らは, SPI-001をPPM1D過剰発現がみられる乳がん由来のMCF-7細胞に投与し, p53のSer15のリン酸化上昇および細胞増殖を抑制することを明らかにしている³⁶⁾.

著者らはさらに, SPI-001を基に各種アナログを合成して構造活性相関を実施し, 新規な阻害剤SL-176の開発に成功している (図4)³⁷⁾. SL-176は*in vitro*においてPPM1Dを特異的に阻害する非競合阻害剤として作用し, PPM1D過剰発現細胞において細胞増殖を著しく抑制することが示されている. SL-176は, 細胞内のp53 Ser15のリン酸化レベルを上昇させ, PPM1D過剰発現細胞MCF-7細胞においてSL-176がG2/M期の停止およびアポトーシスを誘導することが示されている. SL-176は現在報告されているPPM1D阻害剤の中で最も強力な阻害剤であり, 薬剤開発において, 膜透過性を予測する上で非常に重要なパラメーターである分子量<500, およびlogD<5を満たしており³⁸⁾, PPM1Dを標的とした抗がん剤開発のリード化合物として非常に有用である.

2) PPM1D阻害剤と抗がん剤の併用効果

PPM1DのC末端欠損変異が多くのある悪性腫瘍において報告されているが, PPM1Dの450位以降が欠損している変異を持つヒト結腸腺がん由来HCT-116細胞では, 既存の抗がん剤が効きにくいことが報告されている. 我々は, HCT-116において, PPM1D阻害剤SPI-001が既存の抗がん剤Doxorubicinの効果を増強させることを見いだしている (図5)³⁹⁾. さらに, PPM1Dが過剰発現している細胞においても, PPM1D阻害剤GSK2830371と既存の抗がん剤の共投与により, 抗がん剤の効果が増加することが報告されている¹⁷⁾. また, PPM1D阻害剤はPPM1Dが過剰発現している細胞に対して強い増殖抑制効果を示し, 正常細胞にはほとんど効果を示さないことが明らかとなっている¹¹⁾. これらの結果は, PPM1D阻害剤が, C末端欠損変異や過剰発現がみられる悪性腫瘍に対して, 副作用の少ない抗がん剤となりうる可能性を示唆している.

PPM1D特異的阻害剤が有用な抗がん剤のリード化合物となるだけでなく, PPM1Dの機能解明を実施する上で強力な分子ツールとなることが期待される. 近年では, すでに市販のPPM1D阻害剤をツールとして用いたPPM1D機能解明の例も報告されており^{40, 41)}, PPM1D阻害剤がさま

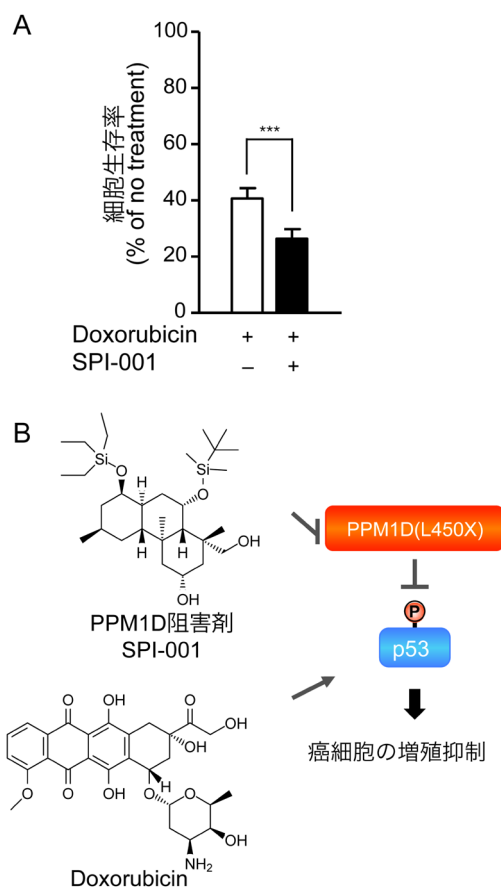


図5 PPM1D阻害剤と抗がん剤の併用効果

(A) PPM1D阻害剤SPI-001と抗がん剤Doxorubicinの併用投与がMCF-7細胞の増殖に及ぼす効果. Doxorubicinは $2\mu M$, SPI-001は $40\mu M$ で48時間インキュベーションし, 細胞増殖率を解析した. *** $p < 0.001$. (B) SPI-001はDoxorubicinのがん細胞増殖効果を増強させる.

ざまな分野において非常に大きな役割を果たしていることを示している.

5. おわりに—PPM1D阻害剤およびPPMファミリー阻害剤の今後の展望

ところで, PPM1Dを介したがん化メカニズムの解明や阻害剤開発が行われている一方で, *Ppm1d*ノックアウトマウスを用いた研究を皮切りに, 正常細胞におけるPPM1Dの機能に注目が集まっている. *Ppm1d*ノックアウトマウスは精巣の萎縮がみられ, 精子形成機構にPPM1Dが関与していることが示唆されている^{42, 43)}. さらに, *Ppm1d*ノックアウトによりCD4陽性T細胞数の上昇とCD8陽性T細胞数の減少がみられ, T細胞, B細胞の機能が低下していることが報告されている⁴²⁾. さらには, PPM1Dが好中球の分化に関与していることや⁴⁴⁾, 造血幹細胞の機能維持に関与することも報告されており⁴⁵⁾, PPM1Dが免疫応答において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきている. さらには, PPM1Dはグルコースの恒常性維持に関与することや⁴⁶⁾, 脂肪蓄積や動脈硬化にも関与している

可能性が示唆されている^{47, 48)}。

以上のように, PPM1Dは精子形成, 免疫応答など, 体内のさまざまな細胞応答において重要な機能を果たしている。PPM1DのスプライスバリエントPPM1D430は精巣および白血球特異的に発現がみられることから, PPM1D430が担う特異的な機能の解明が望まれる。PPM1D阻害剤は, PPM1Dが過剰発現していない細胞においては細胞増殖抑制を示さないことから, 正常細胞においてPPM1Dを特異的に阻害する有効な分子ツールとして, PPM1Dの機能解明への利用も期待される。

これまでにPPM1Dのがん化における機能解明や*in vitro*および*in vivo*における特異的な基質の同定, PPM1D阻害剤開発が進められてきた。しかしながら, 他のPPMファミリーホスファターゼについては特異的な標的タンパク質が同定されていない場合が多く, それらの機能解明および特異的な阻害剤開発のためには, ファミリーメンバーそれぞれの特異的な基質を同定することが必須である。

文 献

- Fiscella, M., Zhang, H., Fan, S., Sakaguchi, K., Shen, S., Mercer, W.E., Vande Woude, G.F., O'Connor, P.M., & Appella, E. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6048–6053.
- Chuman, Y., Kurihashi, W., Mizukami, Y., Nashimoto, T., Yagi, H., & Sakaguchi, K. (2009) *J. Biochem.*, **145**, 1–12.
- Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T., & Barford, D. (1996) *EMBO J.*, **15**, 6798–6809.
- Chuman, Y., Yagi, H., Fukuda, T., Nomura, T., Matsukizono, M., Shimohigashi, Y., & Sakaguchi, K. (2008) *Protein Pept. Lett.*, **15**, 938–948.
- Macurek, L., Benada, J., Mullers, E., Halim, V.A., Krejcikova, K., Burdova, K., Pechackova, S., Hodny, Z., Lindqvist, A., Medema, R.H., & Bartek, J. (2013) *Cell Cycle*, **12**, 251–262.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A.P., Sander, C., & Schultz, N. (2012) *Cancer Discov.*, **2**, 401–404.
- Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013) *Sci. Signal.*, **6**, p11.
- Harrison, M., Li, J., Degenhardt, Y., Hoey, T., & Powers, S. (2004) *Trends Mol. Med.*, **10**, 359–361.
- Bulavin, D.V., Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L.A., Anderson, C.W., Appella, E., & Fornace, A.J. Jr. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 343–350.
- Seoane, M., Iglesias, P., Gonzalez, T., Dominguez, F., Fraga, M., Aliste, C., Forteza, J., & Costoya, J.A. (2008) *PLoS ONE*, **3**, e3632.
- Rayter, S., Elliott, R., Travers, J., Rowlands, M.G., Richardson, T.B., Boxall, K., Jones, K., Linardopoulos, S., Workman, P., Aherne, W., Lord, C.J., & Ashworth, A. (2008) *Oncogene*, **27**, 1036–1044.
- Kleiblova, P., Shaltiel, I.A., Benada, J., Sevcik, J., Pechackova, S., Pohlreich, P., Voest, E.E., Dundr, P., Bartek, J., Kleibl, Z., Medema, R.H., & Macurek, L. (2013) *J. Cell Biol.*, **201**, 511–521.
- Zhang, L., Chen, L.H., Wan, H., Yang, R., Wang, Z., Feng, J., Yang, S., Jones, S., Wang, S., Zhou, W., Zhu, H., Killela, P.J., Zhang, J., Wu, Z., Li, G., Hao, S., Wang, Y., Webb, J.B., Friedman, H.S., Friedman, A.H., McLendon, R.E., He, Y., Reitman, Z.J., Bigner, D.D., & Yan, H. (2014) *Nat. Genet.*, **46**, 726–730.
- Ruark, E., Snape, K., Humburg, P., Loveday, C., Bajrami, I., Brough, R., Rodrigues, D.N., Renwick, A., Seal, S., Ramsay, E., Duarte Sdel, V., Rivas, M.A., Warren-Perry, M., Zachariou, A., Campion-Flora, A., Hanks, S., Murray, A., Ansari Pour, N., Douglas, J., Gregory, L., Rimmer, A., Walker, N.M., Yang, T.P., Adlard, J.W., Barwell, J., Berg, J., Brady, A.F., Brewer, C., Brice, G., Chapman, C., Cook, J., Davidson, R., Donaldson, A., Douglas, F., Eccles, D., Evans, D.G., Greenhalgh, L., Henderson, A., Izatt, L., Kumar, A., Laloo, F., Miedzybrodzka, Z., Morrison, P.J., Paterson, J., Porteous, M., Rogers, M.T., Shanley, S., Walker, L., Gore, M., Houlston, R., Brown, M.A., Caulfield, M.J., Deloukas, P., McCarthy, M.I., Todd, J.A., Breast, Ovarian Cancer Susceptibility, C., Wellcome Trust Case Control, C., Turnbull, C., Reis-Filho, J.S., Ashworth, A., Antoniou, A.C., Lord, C.J., Donnelly, P., & Rahman, N. (2013) *Nature*, **493**, 406–410.
- Hu, W., Feng, Z., Modica, I., Klimstra, D.S., Song, L., Allen, P.J., Brennan, M.F., Levine, A.J., & Tang, L.H. (2010) *Genes Cancer*, **1**, 360–368.
- Wang, P., Rao, J., Yang, H., Zhao, H., & Yang, L. (2011) *J. Surg. Oncol.*, **104**, 679–684.
- Richter, M., Dayaram, T., Gilmartin, A.G., Ganji, G., Pemmasani, S.K., Van Der Key, H., Shohet, J.M., Donehower, L.A., & Kumar, R. (2015) *PLoS ONE*, **10**, e0115635.
- Moon, S.H., Lin, L., Zhang, X., Nguyen, T.A., Darlington, Y., Waldman, A.S., Lu, X., & Donehower, L.A. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 12935–12947.
- Lu, X., Nguyen, T.A., Moon, S.H., Darlington, Y., Sommer, M., & Donehower, L.A. (2008) *Cancer Metastasis Rev.*, **27**, 123–135.
- Natrajan, R., Lambros, M.B., Rodriguez-Pinilla, S.M., Moreno-Bueno, G., Tan, D.S., Marchio, C., Vatcheva, R., Rayter, S., Mahler-Araujo, B., Fulford, L.G., Hungermann, D., Mackay, A., Grigoriadis, A., Fenwick, K., Tamber, N., Hardisson, D., Tutt, A., Palacios, J., Lord, C.J., Buerger, H., Ashworth, A., & Reis-Filho, J.S. (2009) *Clin. Cancer Res.*, **15**, 2711–2722.
- Goloudina, A.R., Mazur, S.J., Appella, E., Garrido, C., & Demidov, O.N. (2012) *Cell Cycle*, **11**, 1883–1887.
- Lu, X., Nguyen, T.A., Appella, E., & Donehower, L.A. (2004) *Cell Cycle*, **3**, 1363–1366.
- Salminen, A. & Kaarniranta, K. (2011) *Cell. Signal.*, **23**, 747–752.
- Yamaguchi, H., Durell, S.R., Chatterjee, D.K., Anderson, C.W., & Appella, E. (2007) *Biochemistry*, **46**, 12594–12603.
- Shreeram, S., Hee, W.K., Demidov, O.N., Kek, C., Yamaguchi, H., Fornace, A.J. Jr., Anderson, C.W., Appella, E., & Bulavin, D.V. (2006) *J. Exp. Med.*, **203**, 2793–2799.
- Lu, X., Bocangel, D., Nannenga, B., Yamaguchi, H., Appella, E., & Donehower, L.A. (2004) *Mol. Cell*, **15**, 621–634.
- Zhang, H., Wang, Z., & Zhang, Z. (2013) *Nucleic Acids Res.*, **41**, 8085–8093.
- Hayashi, R., Tanoue, K., Durell, S.R., Chatterjee, D.K., Jenkins, L.M., Appella, D.H., & Appella, E. (2011) *Biochemistry*, **50**, 4537–4549.
- Ruggero, D. (2012) *Sci. Signal.*, **5**, pe38.
- Le Guezennec, X. & Bulavin, D.V. (2010) *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 109–114.
- Yamaguchi, H., Durell, S.R., Feng, H., Bai, Y., Anderson, C.W., & Appella, E. (2006) *Biochemistry*, **45**, 13193–13202.
- Bang, J., Yamaguchi, H., Durell, S.R., Appella, E., & Appella, D.H. (2008) *ChemMedChem*, **3**, 230–232.
- Belova, G.I., Demidov, O.N., Fornace, A.J. Jr., & Bulavin, D.V.

- (2005) *Cancer Biol. Ther.*, **4**, 1154–1158.
- 34) Gilmartin, A.G., Faltg, T.H., Richter, M., Groy, A., Seefeld, M.A., Darcy, M.G., Peng, X., Federowicz, K., Yang, J., Zhang, S.Y., Minthorn, E., Jaworski, J.P., Schaber, M., Martens, S., McNulty, D.E., Sinnamon, R.H., Zhang, H., Kirkpatrick, R.B., Nevins, N., Cui, G., Pietrak, B., Diaz, E., Jones, A., Brandt, M., Schwartz, B., Heerding, D.A., & Kumar, R. (2014) *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 181–187.
 - 35) Cheeseman, M.D., Faisal, A., Rayter, S., Barbeau, O.R., Kalusa, A., Westlake, M., Burke, R., Swan, M., van Montfort, R., Linardopoulos, S., & Jones, K. (2014) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 3469–3474.
 - 36) Yagi, H., Chuman, Y., Kozakai, Y., Imagawa, T., Takahashi, Y., Yoshimura, F., Tanino, K., & Sakaguchi, K. (2012) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 729–732.
 - 37) Ogasawara, Y., Kiyota, Y., Chuman, Y., Kowata, A., Yoshimura, F., Tanino, K., Kamada, R., & Sakaguchi, K. (2015) *Bioorg. Med. Chem.*, in press.
 - 38) Egan, W.J. & Lauri, G. (2002) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 273–289.
 - 39) Kozakai, Y., Kamada, R., Kiyota, Y., Yoshimura, F., Tanino, K., & Sakaguchi, K. (2014) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 5593–5596.
 - 40) Lee, J.S., Park, J.R., Kwon, O.S., Kim, H., Fornace, A.J. Jr., & Cha, H.J. (2014) *J. Dermatol. Sci.*, **73**, 125–134.
 - 41) Zhang, L., Liu, L., He, Z., Li, G., Liu, J., Song, Z., Jin, H., Rudolph, K.L., Yang, H., Mao, Y., Zhang, L., Zhang, H., Xiao, Z., & Ju, Z. (2015) *Hepatology*, **61**, 2030–2041.
 - 42) Choi, J., Nannenga, B., Demidov, O.N., Bulavin, D.V., Cooney, A., Brayton, C., Zhang, Y., Mbawuike, I.N., Bradley, A., Appella, E., & Donehower, L.A. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1094–1105.
 - 43) Filipponi, D., Muller, J., Emelyanov, A., & Bulavin, D.V. (2013) *Cancer Cell*, **24**, 528–541.
 - 44) Liu, G., Hu, X., Sun, B., Yang, T., Shi, J., Zhang, L., & Zhao, Y. (2013) *Blood*, **121**, 519–529.
 - 45) Chen, Z., Yi, W., Morita, Y., Wang, H., Cong, Y., Liu, J.P., Xiao, Z., Rudolph, K.L., Cheng, T., & Ju, Z. (2015) *Nat. Commun.*, **6**, 6808.
 - 46) Armata, H.L., Chamberland, S., Watts, L., Ko, H.J., Lee, Y., Jung, D.Y., Kim, J.K., & Sluss, H.K. (2015) *Mol. Endocrinol.*, **29**, 28–39.
 - 47) Joe, Y., Do, M.H., Seo, E., Kang, S., Park, H.T., Yun, J., & Lee, H.J. (2010) *Life Sci.*, **86**, 716–721.
 - 48) Brichkina, A. & Bulavin, D.V. (2012) *Autophagy*, **8**, 1545–1547.

著者寸描

●鎌田 瑠泉 (かまだ るい)



北海道大学大学院理学院理学研究院化学部門助教。博士（理学）。

■略歴 1983年北海道に生る。2006年北海道大学理学部化学科卒業。10年同大学院理学院化学専攻博士課程修了。11年京都大学大学院工学研究科博士研究員。12年米国NIH/NICHD Visiting Fellow。14年より現職。

■研究テーマと抱負 自然免疫応答におけるSer/ThrホスファターゼPPM1Dのエピジェネティクス修飾を介した機能解明を目指している。

■趣味 野球観戦、映画鑑賞、寺社・城巡り。

●中馬 吉郎 (ちゅうまん よしろう)



新潟大学理学部化学科 准教授。博士（理学）。

■略歴 1973年鹿児島県に生る。96年九州大学理学部化学科卒業。2001年九州大学理学府分子科学専攻博士課程修了。同年米国NIH/NCI博士研究員。03年北海道大学大学院理学研究科（坂口研）助手。07年同大学助教。13年より現職。

■研究テーマと抱負 タンパク質リン酸化制御破綻と疾患との関わりについてSer/Thrホスファターゼ着目し、癌を含む疾患メカニズムの解明と新規酵素活性制御分子の開発に取り組んでいる。

■趣味 料理、釣り、剣道。

●小境 夕紀 (こざかい ゆうき)



大塚製薬株式会社研究員。博士（理学）。

■略歴 1987年北海道に生る。2010年北海道大学理学部卒業。15年同大学院総合化学院にて博士課程を修了し、博士（理学）の学位を取得。15年より現職。

■趣味 旅行・英会話。

●坂口 和靖 (さかぐち かずやす)



北海道大学大学院理学研究院化学部門教授。理学博士。

■略歴 1960年福岡県に生る。83年九州大学理学部卒業。89年同大学院理学研究科博士課程修了。同年米国NIH/NCI Visiting Fellow, Visiting Associate, Staff Scientistを経て99年九州大学大学院理学研究科助教授。2003年より現職。

■研究テーマと抱負 現在、癌抑制タンパク質p53をターゲットとした生体反応の定量化と閾値の解明、PPM1Dホスファターゼの機能とその制御機構解明、および、ペプチド・タンパク質の自己組織化制御の研究を進めている。『“化学反応”の集積がいかにして“生命”となりうるか』を解明することを夢見て研究を行っている。

■趣味 野鳥・野草を見ること。知らない道をドライブすること。