

## プロテインホスファターゼ PPM1 活性調節物質の特異性解明と機能解析

### [1] 組織

代表者：大西 素子  
(中部大学応用生物学部)  
対応者：小林 孝安  
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 10 万円

### [2] 研究経過

PPM ファミリーのプロテイン Ser/Thr ホスファターゼはオキサ酸非感受性、二価の金属イオン依存性であることを特徴とし、哺乳類では異なる遺伝子にコードされる 17 種類のサブタイプの存在が知られている。このうち PPM1D は乳癌を初め神経芽腫、髄芽腫および胃癌など様々なヒトのがんで遺伝子の増幅と高発現がみとめられるがん原遺伝子産物である。PPM1D の高発現がみとめられる乳癌や卵巣癌の患者では、化学療法の効果が減少し、予後が不良であることが知られており、PPM1D 遺伝子欠損マウスはがんに対する抵抗性を示すことが知られている。そのため PPM1D はがん治療の標的の 1 つとして注目されている。また同じ PPM1 ホスファターゼである PPM1A は、p53 の脱リン酸化による活性化や、Smad2/3 の脱リン酸化と核外移行促進などの機能により、腫瘍形成やがん細胞の浸潤の抑制に関わる腫瘍形成抑制因子として作用することが示唆されており、その活性化は腫瘍の悪性化阻害に役立つ可能性があると考えられる。

一方、申請者は大腸菌で発現したマウス PPM1D または PPM1A を用いて、これらを阻害または活性化する低分子化合物を広く探索した結果、これまでに複数の阻害物質や活性化物質を見出した。しかしながら探索標的以外のプロテインホスファターゼに対するこれらの化合物の効果は未だ解析されておらず、その特異性は明らかでは無い。そこで本研究ではこれらの化合物の特異性と細胞生存率に対する効果を明らかにし、新規腫瘍制御法の開発を目指す。

以下に研究活動状況の概要を記す。

これまで、スクリーニングには、大腸菌で発現し

た組換えタンパク質を用いてきたが、発現量・比活性の低さや基質特性の変化などが技術的な問題点となっていた。そこでまず、発現系を大腸菌から、性質がより哺乳動物細胞に類似している昆虫細胞に変えることでこの問題の改善を試みた。7 月から 12 月までの約半年間、加齢研究所内に設置されている東北大学遺伝子実験センターに滞在し、小林准教授のもとで本実験を行った。研究打ち合わせは必要な時に随時行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

Bac-to-Bac システムによって組換えバキュロウイルスを作製し、これを Sf21 細胞に感染させることによって、ヒト PPM1A、PPM1B $\beta$ 1、PPM1B $\beta$ X または C 末を欠損した PPM1D 変異体を発現した。これらはいずれも 6xHis-Tag 融合タンパク質として発現し、Ni 結合アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。その結果、図のように各組換えタンパク質が確認された。

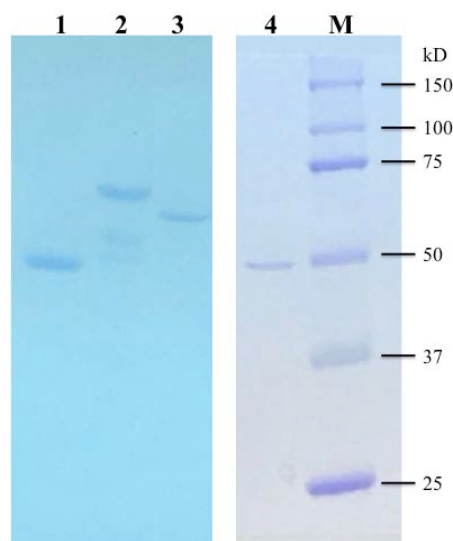


図. Sf21 細胞における PPM ファミリープロテインホスファターゼの発現

1:PPM1B $\beta$ 1、2:PPM1B $\beta$ X、3:PPM1D 変異体、

#### 4:PPM1A、M:分子量マーカー

##### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究により昆虫細胞における PPM ファミリーのプロテインホスファターゼ発現系を構築することができた。これにより PPM1 ホスファターゼ活性調節物質の特異性を簡便に評価するためのツールが得られただけでなく、これまで大腸菌で発現した酵素を用いて行っていた活性調節物質の探索を、より生理的な条件に近い環境で行うことが可能となり、新規がん治療薬の開発に発展する可能性がある。

#### [4] 成果資料

該当無し